

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE FARMÁCIA



**Pectinases e Alta Pressão: Aplicação ao Controlo de
Qualidade dos Sumos**

ANA FILIPA PIRES MADEIRA

DISSERTAÇÃO

MESTRADO EM CONTROLO DE QUALIDADE E

TOXICOLOGIA DOS ALIMENTOS

2013

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE FARMÁCIA



**Pectinases e Alta Pressão: Aplicação ao Controlo de
Qualidade dos Sumos**

ANA FILIPA PIRES MADEIRA

Dissertação orientada por: **Prof. Doutora Maria Henriques Ribeiro**

MESTRADO EM CONTROLO DE QUALIDADE E

TOXICOLOGIA DOS ALIMENTOS

2013

Agradecimentos

Agradeço a todos os que tornaram possível, de uma forma ou de outra, a execução desta tese.

Primeiro que tudo, quero expressar os meus mais sinceros agradecimentos à minha orientadora, Prof. Maria Henriques Ribeiro, pelos ensinamentos, críticas e sugestões, bem como pelo enorme apoio, compreensão e, claro, orientação e, ao meu co-orientador, Prof. António Alfaia, pelo tempo despendido e ajuda prestada.

À minha colega e amiga Bruna Sousa, pela amizade e força, pela ajuda prestada, e pela companhia nos longos dias de trabalho.

Ao Mário Nunes, pelo auxílio e conselhos prestados e, pela paciência que teve para comigo ao longo destes meses

Em especial, ao meu Pai e à minha Mãe, que me apoiaram e “lutaram” comigo para que conseguisse concluir mais uma etapa da minha vida. A eles devo tudo o que sou e tudo o que consegui até hoje. Sempre estiveram comigo e sempre me disseram as palavras certas na altura certa, mesmo às vezes não sendo as que eu gostava de ouvir. Foram cruciais para o meu desenvolvimento como pessoa e aluna. Muito obrigado por todo o amor e carinho e, por estarem sempre comigo.

Sem esquecer a minha irmã, pessoa com quem partilhei imensos momentos e que, de uma forma ou de outra, me acompanhou nesta etapa. Obrigada pela estrelinha que trouxeste a este mundo, a minha adorada sobrinha, que me iluminou e me deu força para concluir este trabalho.

Claro que não pode faltar o tão merecido agradecimento ao meu namorado, que com a sua paciência, tolerância e compreensão, sempre ouviu os meus desatinos com o decorrer da dissertação e com os problemas com que me deparei. O seu amor, carinho e apoio foram fatores de grande importância e aos quais dou imenso valor. Rodrigo, obrigada por caminhares sempre comigo.

Resumo

As pectinases são enzimas que degradam substâncias pécticas e, são amplamente utilizadas pelas indústrias de sumos e bebidas para melhor a qualidade do processo e do produto.

O objetivo deste trabalho foi estudar a ação conjugada de pectinases e da tecnologia de alta pressão no tratamento de sumos e, aliar a estes dois processos a pasteurização, de forma a obter um sumo clarificado e isento de microrganismos.

Foram selecionadas para este estudo as pectinases de *Aspergillus aculeatus* e *Aspergillus niger*. A avaliação da atividade destas enzimas foi efetuada recorrendo ao método DNS, que consiste na determinação da concentração de glucose, derivada da degradação da pectina pois, uma unidade de glucose corresponde a uma unidade de ácido galacturónico.

As enzimas foram imobilizadas pelo método de inclusão, usando como suporte o quitosano. Tanto a imobilização como o processamento a alta pressão mostraram ser eficazes na proteção destas enzimas a temperaturas elevadas. Contudo, no sumo, a temperatura elevada provocou uma diminuição da atividade das enzimas, impossibilitando a realização da pasteurização em simultâneo com os tratamentos enzimático e a alta pressão.

Os melhores resultados no sumo foram obtidos a 45 °C e à pressão de 200 MPa. De ambas as pectinases, a pectinase de *Aspergillus aculeatus* mostrou ser mais eficaz na clarificação do sumo, apresentando uma atividade superior à pectinase de *Aspergillus niger*.

Palavras-chave: Pectinase; Imobilização; Quitosano; Alta Pressão; Temperatura; *Aspergillus aculeatus*; *Aspergillus niger*

Abstract

Pectinases are enzymes that degrade pectic substances and are widely used in juice and fruit beverages to improve the quality of the process and the product.

The objective of this study was study the conjugated action of pectinases and high pressure technology on juice treatment, and combine pasteurization with these two processes, in order to obtain a clarified juice and free of microorganisms.

We selected for this study pectinases from *Aspergillus aculeatus* and *Aspergillus niger*. The evaluation of the activity of these enzymes was performed using the DNS method, which consists in determining the glucose concentration derived from the degradation of pectin because one unit of glucose corresponds to a unit of galacturonic acid.

Enzymes were immobilized by the inclusion method, using the chitosan as a support. Both immobilization as processing high pressure shown be effective in protecting these enzymes at high temperatures. However, on juice, the high temperature caused a decrease in the activity of enzymes, excluding the achievement of pasteurisation simultaneously with enzymatic treatments and the high pressure.

The better results at juice, were obtained to 45 °C and 200 MPa of pressure. Of both pectinases, pectinase from *Aspergillus aculeatus* shown be most effective in clarifying juice, presenting an activity higher than pectinase from *Aspergillus niger*.

Key-words: Pectinase; Immobilization; Chitosan; High Pressure; Temperature; *Aspergillus aculeatus*; *Aspergillus niger*

Índice Geral

Agradecimentos.....	3
Resumo	4
Abstract	5
Índice de Figuras.....	9
Índice de Tabelas.....	12
Índice de Abreviaturas e Nomenclaturas	14
Capítulo 1 - Introdução.....	16
1. Introdução.....	17
1.1 Substâncias pécticas.....	17
1.2 Enzimas.....	20
1.2.1 Propriedades gerais	20
1.2.2 Efeito da temperatura e do pH na atividade enzimática	22
1.2.3 Cinética enzimática.....	24
1.2.3.1 A velocidade da reação	24
1.2.3.2 Efeito da concentração de substrato na velocidade de reação	25
1.2.4 Enzimas pectolíticas.....	27
1.3 Imobilização das enzimas pectolíticas.....	31
1.3.1 Enzima nativa <i>versus</i> Enzima imobilizada.....	31
1.3.2 Métodos de imobilização.....	32
1.3.3 Vantagens do processo de imobilização.....	33
1.3.4 Quitosano – Suporte de imobilização.....	35
1.4 Alta Pressão como Processo Tecnológico	40
1.4.1 O efeito do processamento a Alta-Pressão na cor	42
1.4.2 O efeito do processamento a Alta-Pressão na textura	43
1.4.3 O efeito do processamento a Alta-Pressão no flavor.....	44
Capítulo 2 - Objetivos	46
2. Objectivos	47
Capítulo 3 - Materiais e Métodos.....	48
3.1 Métodos experimentais	49
3.1.1 Imobilização da enzima	49

3.1.2 Ensaio à pressão atmosférica.....	51
3.1.2.1 Ensaio com solução de substrato	51
3.1.2.2 Ensaio com sumo de laranja	52
3.1.3 Ensaio a alta pressão	52
3.1.3.1 Ensaio com solução de substrato	54
3.1.3.2 Ensaio com sumo de laranja	54
3.2 Métodos analíticos	55
3.2.1 Método do Ácido Dinitrosalicílico (DNS)	55
3.2.2 Método de Bradford	57
3.2.3 Análise dos carotenoides.....	59
3.2.4 Determinação dos açúcares - °Brix.....	59
3.2.5 Determinação do pH.....	60
3.2.6 Determinação do ácido ascórbico (Vitamina C)	60
Capítulo 4 - Resultados e Discussão	63
4.1 Estudo da atividade das pectinases à pressão atmosférica	64
4.1.1 Pectinase de <i>Aspergillus aculeatus</i> em solução	64
4.1.1.1 Estudo do efeito da variação de concentração de enzima.....	64
4.1.1.2 Estudo do efeito da variação de concentração de substrato	67
4.1.1.3 Estudo do efeito da variação da temperatura.....	68
4.1.2 Pectinase de <i>Aspergillus aculeatus</i> imobilizada	70
4.1.3 Pectinase de <i>Aspergillus niger</i> em solução.....	74
4.1.3.1 Estudo do efeito da variação de concentração de enzima.....	74
4.1.3.2 Estudo do efeito da variação de concentração de substrato	75
4.1.3.3 Estudo do efeito da variação da temperatura.....	76
4.1.4 Pectinase de <i>Aspergillus niger</i> imobilizada.....	77
4.2 Estudo da atividade das pectinases a alta pressão	78
4.2.1 Estudo do efeito da pressão	79
4.2.2 Estudo do efeito do tempo	80
4.2.3 Estudo do efeito da temperatura	82
4.3 Estudo da atividade das pectinases a alta pressão no sumo	85
4.4 Análises efetuadas ao sumo	86
4.4.1 Determinação do pH.....	86

4.4.2 Determinação dos açúcares - °Brix.....	88
4.4.3 Determinação dos carotenoides.....	90
4.4.4 Determinação do ácido ascórbico (Vitamina C)	92
4.4.5 Análise visual.....	94
Capítulo 5 - Conclusões	97
5. Conclusões	98
Capítulo 6 - Trabalho Futuro	101
Referências Bibliográficas.....	103

Índice de Figuras

Figura 1 – Estrutura esquemática da pectina	19
Figura 2 – Estrutura da molécula de pectina	20
Figura 3 – Dois modelos de formação do complexo enzima-substrato	21
Figura 4 – Curva da atividade de uma enzima em função do pH	23
Figura 5 – Curva da atividade de uma enzima em função da temperatura	24
Figura 6 – Velocidades de reação enzimática com diferentes concentrações de substrato	25
Figura 7 – Curva hiperbólica da reação enzimática	26
Figura 8 – Esquema de uma reação enzimática	26
Figura 9 – Modo de ação enzimática das pectinases numa molécula de pectina	29
Figura 10 – Adição das pectinases em diferentes fases do processo de produção de sumos de fruta	31
Figura 11 – Características da enzima imobilizada	33
Figura 12 – Formação do quitosano por N-deacetilação da quitina	36
Figura 13 – Estrutura molecular da celulose, quitina e quitosano	37
Figura 14 – Aparelho de alta pressão	53
Figura 15 – Aparelho de alta pressão utilizado nos ensaios	53
Figura 16 – Reta de calibração da glucose	57
Figura 17 – Reta de calibração da proteína da <i>Aspergillus aculeatus</i>	58
Figura 18 – Reta de calibração da proteína da <i>Aspergillus niger</i>	59
Figura 19 – Ensaio com pectinase de <i>Aspergillus aculeatus</i> numa concentração de 100 µL/mL, a pH 4,0, em solução tampão de acetato de sódio 0,02 M, à temperatura de 45 °C e com uma concentração de pectina de 400 µg/mL	65
Figura 20 – Ensaio com pectinase de <i>Aspergillus aculeatus</i> nas concentrações de 200 µL/mL e 400 µL/mL, a pH 4,0, em solução tampão de acetato de sódio 0,02 M, à temperatura de 45 °C e com uma concentração de pectina de 400 µg/mL	66
Figura 21 – Ensaios com pectinase de <i>Aspergillus aculeatus</i> (200 µg/mL) em soluções com diferentes concentrações de substrato, a pH 4,0, à temperatura de 45 °C	67

Figura 22 – Ensaio com pectinase de *Aspergillus aculeatus* (200 µg/mL) realizados às temperaturas de 50, 60, 70, 80 e 90 °C, a pH 4,0, em solução tampão de acetato de sódio 0,02 M, com uma concentração de pectina de 400 µg/mL _____ **69**

Figura 23 – Ensaio com pectinase de *Aspergillus aculeatus* (200 µg/mL) realizados às temperaturas de 45 e 60 °C, a pH 4,0, em solução tampão de acetato de sódio 0,02 M, com uma concentração de pectina de 400 µg/mL _____ **70**

Figura 24 – Ensaio do estudo da atividade e estabilidade da pectinase de *Aspergillus aculeatus* imobilizada em quitosano (2%) usando glutaraldeído como solução de consolidação da matriz _____ **71**

Figura 25 – Ensaio do estudo da atividade e estabilidade da pectinase de *Aspergillus aculeatus* imobilizada em quitosano (2%) usando uma mistura glutaraldeído e sulfato de sódio como solução de consolidação da matriz _____ **72**

Figura 26 – Ensaio do estudo da atividade da pectinase de *Aspergillus aculeatus* em solução e imobilizada em quitosano (2%) com duas soluções de consolidação de matriz _____ **73**

Figura 27 – Ensaio com pectinase de *Aspergillus niger* em diferentes concentrações a pH 4,0, à temperatura de 45 °C e com uma concentração de pectina de 400 µg/mL _____ **74**

Figura 28 – Ensaio com pectinase de *Aspergillus niger* (100 µg/mL) em soluções com diferentes concentrações de substrato, a pH 4,0, à temperatura de 45 °C _____ **75**

Figura 29 – Ensaio com pectinase de *Aspergillus niger* (100 µg/mL), realizado à temperatura de 45 e 80 °C, a pH 4,0, em solução tampão de acetato de sódio 0,02 M, com uma concentração de pectina de 400 µg/mL _____ **76**

Figura 30 – Ensaio do estudo da atividade e estabilidade da pectinase de *Aspergillus niger* imobilizada em quitosano (2%) usando uma mistura glutaraldeído e sulfato de sódio como solução de consolidação da matriz _____ **77**

Figura 31 – Comparação dos ensaios do estudo da atividade e estabilidade das pectinases de *Aspergillus aculeatus* e *Aspergillus niger* imobilizadas em quitosano (2%), usando uma mistura glutaraldeído e sulfato de sódio como solução de consolidação da matriz _____ **78**

Figura 32 – Ensaio do estudo do tempo da reacção enzimática com a pectinase de *Aspergillus aculeatus* a 45 °C, a uma pressão de 200 MPa _____ **81**

Figura 33 – Ensaio do estudo do tempo da reacção enzimática com a pectinase de *Aspergillus niger* a 45 °C, a uma pressão de 200 MPa _____ **81**

Figura 34 – Microesferas de pectinase de *Aspergillus aculeatus* após ensaio à pressão atmosférica, às temperaturas de 45 e 85 °C, respetivamente _____ **84**

Figura 35 – Microesferas de pectinase de *Aspergillus aculeatus* após ensaios a 85 °C, submetidas à pressão atmosférica e a 200 MPa, respetivamente _____ **84**

Figura 36 – Amostras do ensaio realizado a 45 °C, a uma pressão de 200 MPa, com duração de 30 minutos _____ **94**

Figura 37 – Amostras do ensaio realizado a 75 °C, a uma pressão de 200 MPa, com duração de 30 minutos _____ **95**

Figura 38 – Amostras do ensaio realizado a 45 °C, a uma pressão de 200 MPa, com duração de 120 minutos _____ **95**

Figura 39 – Amostras do ensaio realizado com pectinase de *Aspergillus niger*, à temperatura de 45 °C, a 200 MPa e à pressão atmosférica, com duração de 120 minutos _____ **96**

Figura 40 – Amostras do ensaio realizado com pectinase de *Aspergillus aculeatus*, à temperatura de 45 °C, a 200 MPa e à pressão atmosférica, com duração de 120 minutos _____ **96**

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Peso molecular de substâncias pécticas _____	17
Tabela 2 – Composição em pectina em diferentes frutas e vegetais _____	18
Tabela 3 – Métodos de imobilização de enzimas _____	32
Tabela 4 – Amostragens dos 180 minutos e das 24 horas dos ensaios com pectinase de <i>Aspergillus aculeatus</i> em soluções de substrato com concentrações de 100, 200, 300, 400 e 500 µg/mL _____	68
Tabela 5 – Ensaio do estudo da pectinase de <i>Aspergillus aculeatus</i> a diferentes pressões _____	79
Tabela 6 – Ensaio do estudo da pectinase de <i>Aspergillus niger</i> a diferentes pressões _____	79
Tabela 7 – Ensaio do estudo da pectinase de <i>Aspergillus aculeatus</i> , em solução e imobilizada em quitosano (2%) a diferentes temperaturas, à pressão atmosférica e a 200 MPa _____	82
Tabela 8 – Ensaio do estudo da atividade da pectinase de <i>Aspergillus niger</i> , em solução e imobilizada em quitosano (2%) a diferentes temperaturas, à pressão atmosférica e a 200 MPa _____	83
Tabela 9 – Ensaio do estudo das pectinases a 45 °C e 75 °C, a uma pressão de 200 MPa, com duração de 30 minutos, no sumo _____	85
Tabela 10 – Ensaio do estudo das pectinases à pressão atmosférica e a 200 MPa, a 45 °C, com duração de 120 minutos, no sumo _____	86
Tabela 11 – Análise do pH do sumo dos ensaios do estudo das pectinases a 45 e 75 °C, a uma pressão de 200 Mpa (AP) _____	87
Tabela 12 – Análise do pH do sumo dos ensaios do estudo das pectinases a 45 °C, à pressão atmosférica e à pressão de 200 Mpa (AP) _____	87
Tabela 13 – Comparação dos valores de pH obtidos nos ensaios com duração de 30 e 120 minutos, a 45 °C e a 200 MPa _____	88
Tabela 14 – Análise da determinação do °Brix no sumo dos ensaios do estudo das pectinases a 45 e 75 °C, a uma pressão de 200 MPa _____	88
Tabela 15 – Análise da determinação do °Brix no sumo dos ensaios do estudo das pectinases a 45 °C, à pressão atmosférica e à pressão de 200 MPa _____	89

Tabela 16 – Comparação dos valores de °Brix obtidos nos ensaios com duração de 30 e 120 minutos, a 45 °C e a 200 MPa _____ **90**

Tabela 17 – Análise da determinação de carotenoides no sumo dos ensaios do estudo das pectinases a 45 e 75 °C, a uma pressão de 200 MPa _____ **90**

Tabela 18 – Análise da determinação dos carotenoides no sumo dos ensaios do estudo das pectinases a 45 °C, à pressão atmosférica e à pressão de 200 MPa _____ **91**

Tabela 19 – Análise da determinação do ácido ascórbico no sumo dos ensaios do estudo da atividade das pectinases a 45 e 75 °C, a uma pressão de 200 MPa _____ **92**

Tabela 20 – Análise da determinação do ácido ascórbico no sumo dos ensaios do estudo das pectinases a 45 °C, à pressão atmosférica e à pressão de 200 MPa _____ **93**

Tabela 21 – Comparação dos valores de ácido ascórbico, obtidos nos ensaios com duração de 30 e 120 minutos, a 45 °C e a 200 MPa _____ **93**

Índice de Abreviaturas e Nomenclaturas

AA – Ácido ascórbico

AP – Alta Pressão

E – Enzima

ES – Complexo enzima-substrato

GalpA – α -D-galacturónico

GS – Galacturonanas substituídas

HG – Homogalacturonana

KCl – Cloreto de potássio

kDa – kiloDalton

K_M – Constante de Michaelis-Menten

MPa – MegaPascal

NaOH – Hidróxido de sódio

Na₂SO₄ – Sulfato de sódio

P – Produto

PE – Pectinesterases

PG – Poligalacturonases

PGL – Poligalacturonato liases

PMG – Polimetilgalacturonases

PMGE – Pectinesterase ou Polimetilgalacturonato esterase

PMGL – Polimetilgalacturonato liases

PPO – Polifenoloxidase

RG I – Ramnogalacturonana I

RG II – Ramnogalacturonana II

S – Substrato

V – Velocidade da reação

V_0 – Velocidade inicial da reação

V_{\max} – Velocidade máxima da reação

XG – Xilogalacturonana

[S] – Concentração do substrato

ΔP – Diferença entre o produto final e o produto inicial

ΔP – Diferença entre o substrato final e o substrato inicial

Δt – Variação do tempo da reação

Δt_0 – Variação do tempo inicial da reação

Capítulo 1

Introdução

1. Introdução

1.1 Substâncias pécticas

Substâncias pécticas, também conhecidas como pectinas, são heteropolissacáridos que se encontram na lamela média e na parede celular primária de vegetais superiores (Alkorta *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 2010). A composição depende não só das espécies mas também do tecido, estado de crescimento e maturação, e condições de crescimento. Nas frutas não maduras, a pectina está ligada à microfibrila de celulose na parede celular. Esta pectina insolúvel e confere rigidez às paredes celulares. Contudo, durante o amadurecimento, a estrutura da pectina é alterada por enzimas naturais da fruta. Estas alterações envolvem a rutura total da cadeia de pectina ou de cadeias laterais ligadas às unidades, que foram a cadeia principal. Em ambos os casos, a pectina torna-se mais solúvel e obtém-se, consequentemente, um tecido vegetal amolecido (Kashyap *et al.*, 2001). Não existem substâncias pécticas uniformes. Estas são heterogéneas, apresentam as suas respetivas estruturas químicas, peso molecular variável, contudo elevado (entre 25 e 360 kDa – Tabela 1) (Alkorta *et al.*, 1998) e são carregadas negativamente (Jayani *et al.*, 2005).

Tabela 1 – Peso molecular de substâncias pécticas (Jayani *et al.*, 2005).

Fonte	Peso molecular das substâncias pécticas (kDa)
Maçã e limão	200 – 360
Pera e ameixa	25 – 35
Laranja	40 – 50
Polpa de beterraba sacarina	40 – 50

As substâncias pécicas correspondem a 0.5-4% do peso de material fresco, o que se pode verificar na Tabela 2 (Jayani *et al.*, 2005).

Tabela 2 – Composição em pectina em diferentes frutas e vegetais (Jayani *et al.*, 2005)

Fruta/vegetal	Tecido	Substâncias pécicas (%)
Maçã	Fresco	0.5 - 1.6
Banana	Fresco	0.7 - 1.2
Pêssego	Fresco	0.1 - 0.9
Morango	Fresco	0.6 - 0.7
Cereja	Fresco	0.2 - 0.5
Ervilha	Fresco	0.9 - 1.4
Cenoura	Matéria seca	6.9 - 18.6
Polpa de laranja	Matéria seca	12.4 - 28.0
Batata	Matéria seca	1.8 - 3.3
Tomate	Matéria seca	2.4 - 4.6
Polpa de beterraba sacarina	Matéria seca	10.0 - 30.0

A pectina (Figuras 1 e 2) é definida como “uma família de polissacáridos complexos que contém unidades de α -D-galacturónico (GalpA)”. Esta família compreende 4 classes de polímeros, denominados de polissacáridos pécicos: homogalacturonanas (HG), ramnogalacturonanas do tipo I (RG I), galacturonanas substituídas (SB), entre as quais encontram-se as ramnogalacturonanas do tipo II (RG II) (Ridley *et al.*, 2001; Yapo *et al.*, 2007) e xilogalacturonanas (XG) (Yu *et al.*, 2010; Yapo, 2011b).

Define-se por homogalacturonana o polissacárido que apresenta uma cadeia linear constituída por unidades de ácido α -D-galacturónico, unidas por ligações do tipo 1 \rightarrow 4, sendo alguns grupos carboxílicos esterificados por grupos metilo (ésteres metílicos) (Ridley *et al.*, 2001; Yapo, 2011a) e, parcialmente ou completamente neutralizados pelos iões de sódio, potássio ou amónio (Kashyap *et al.*, 2001).

As ramnogalacturonanas do tipo I (RG I) são uma classe de polissacáridos que contém a cadeia principal constituída por unidades alternadas de ácido α -D-galacturónico ligadas em C4 e unidades de α -L-ramnose ligadas em C2, formando o dissacárido [\rightarrow 4) α -D-GalpA-(1 \rightarrow 2)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow] repetidas vezes (Ridley *et al.*, 2001; Yapo *et al.*, 2007; Alimardani-Theuil *et al.*, 2011). Estes substituintes geralmente apresentam unidades de arabinose e/ou galactose, podendo ser oligossacáridos ou

polissacáridos como arabinanas, galactanas e/ou arabinogalactanas (Ridley *et al.*, 2001; Yapo *et al.*, 2007).

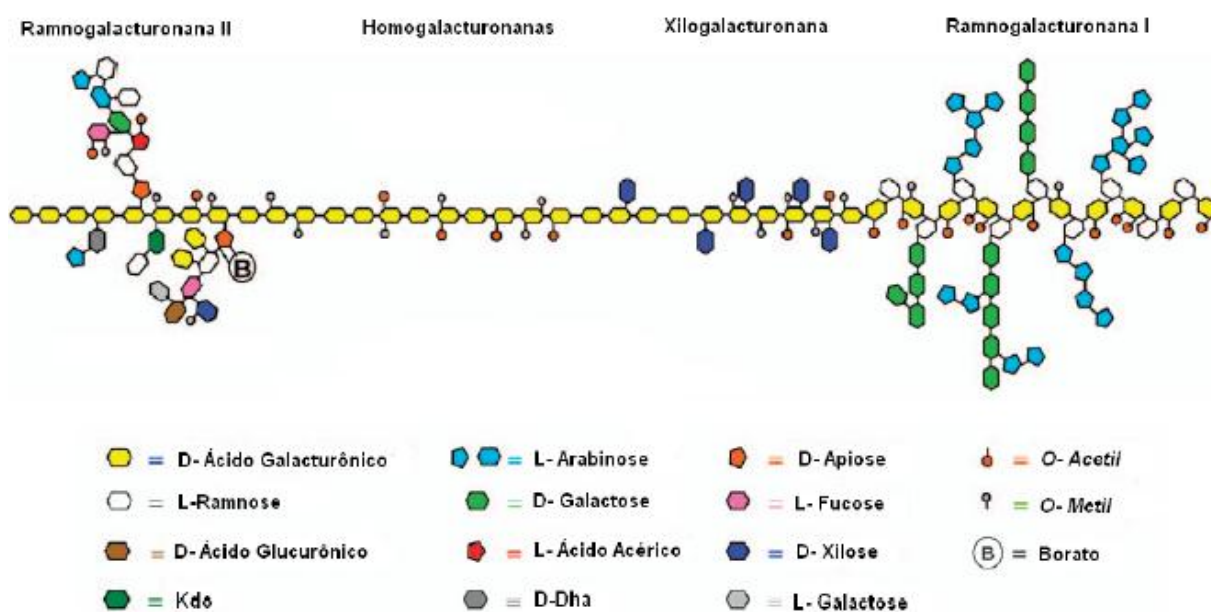


Figura 1 – Estrutura esquemática da pectina (Harholt *et al.*, 2010).

As galacturonanas substituídas (GS), que são um grupo diverso de polissacarídeos, apresentam a cadeia principal constituída por unidades de ácido α -D-galacturônico, unidas por ligações do tipo 1→4 (Ridley *et al.*, 2001). No que se refere às ramnogalacturonanas do tipo II (RG II), as cadeias laterais são, geralmente, substituintes em C2 das unidades de α -D-GalpA e são formadas por oligossacáridos contendo açúcares pouco usuais, como a fucose, o ácido acérico, a apiose e o ácido 3-desoxi-mano-octulosónico (Vidal *et al.*, 2000).

Por fim, as xilogalacturonanas são cadeias de homogalacturonanas substituídas em O-3 por β -D-xilose (Zandleven *et al.*, 2007).

A Sociedade Americana de Química (*American Chemical Society*) classificou as substâncias pécticas em (Alkorta *et al.*, 1998):

- I) Protopectina: insolúvel em água. Representa a maior parte da pectina das frutas não maduras.
- II) Pectina: material solúvel, no qual 75% dos grupos carboxílicos são metilados. Apresenta solubilidade em água e alguns solventes como formamida e glicerol.

III) Ácido pectínico (pectinatos): ácido poligalacturónico que apresenta um número significativo de grupos metoxilo. Pode formar gel com açúcares e ácidos e, caso o conteúdo destes grupos seja reduzido, pode formar gel com alguns iões metálicos.

IV) Ácido péctico (pectatos): ácido poligalacturónico coloidal e isento de grupos metoxilo.

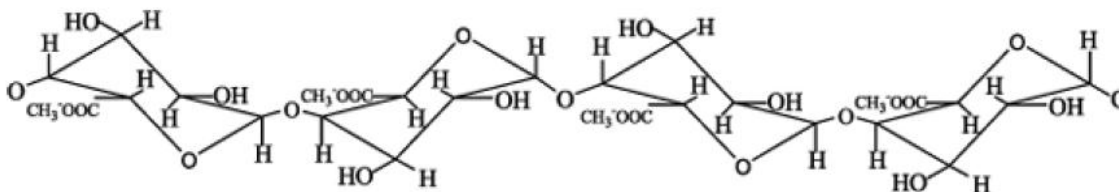


Figura 2 – Estrutura da molécula de pectina (Uenojo e Pastore., 2007).

As substâncias pécticas são responsáveis pela consistência, turbidez e aparência dos sumos de fruta, e a sua presença provoca um aumento considerável na viscosidade do sumo, dificultando a filtração e a clarificação (Alkorta *et al.*, 1998; Fernández-González *et al.*, 2004).

O sumo natural é rico em partículas insolúveis, que são principalmente compostas por substâncias pécticas. Nestas partículas, o núcleo da proteína com uma carga de superfície positiva é revestido pela carga negativa das moléculas de pectina. Esta carga negativa faz com que as moléculas de pectina se repelem (Kashyap *et al.*, 2001).

1.2 Enzimas

1.2.1 Propriedades gerais

As enzimas são catalisadores biológicos que aumentam a velocidade das reações e, apresentam um número de características que tornam o seu uso vantajoso

comparadas com os catalisadores químicos convencionais. Entre essas características vantajosas está um nível elevado de eficiência catalítica, muitas vezes superior ao dos catalisadores químicos, e o elevado grau de especificidade que lhes permite discriminar não só entre reações mas também entre substratos (especificidade do substrato), partes similares de moléculas (regioespecificidade) e entre isómeros óticos (esterioespecificidade) (Cabral *et al.*, 2003; Krajewska, 2004; Lei *et al.*, 2007a; Milétić *et al.*, 2012).

O conceito de centro ativo ou centro catalítico é definido como a zona específica e tridimensional da proteína que permite a interação específica com o substrato. É neste local específico que ocorre a reação química. A isto se deve a enorme especificidade das enzimas relativamente aos substratos.

Existem dois modelos (Figura 3) que explicam a ligação do substrato e formação do complexo enzima-substrato (ES). O primeiro modelo, designado modelo “chave-fechadura” de Emil Fisher (1894), pressupõe que o substrato e o centro ativo terão formas complementares, baseando-se, assim, na especificidade da ação enzimática. O segundo modelo corresponde ao modelo de Koshland (modelo de conformação induzida) em que, tal como diz o conceito, o substrato e o centro ativo só são complementares após a ligação. A forma do centro ativo é modificada pela ligação do substrato. (Cabral *et al.*, 2003).

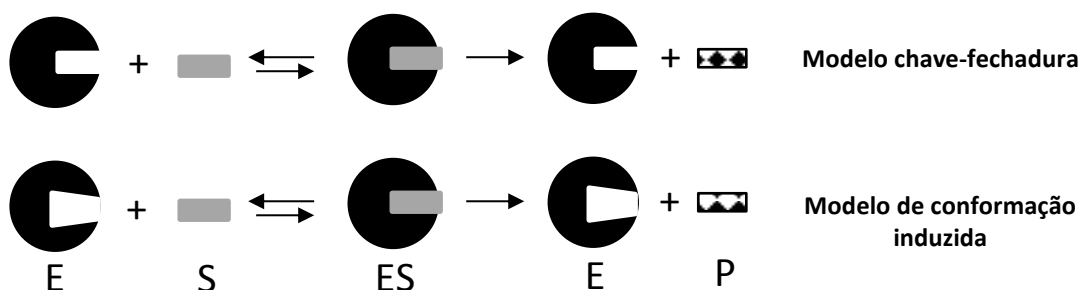


Figura 3 – Dois modelos de formação do complexo enzima-substrato (Pereira, 2010).

Estas especificidades garantem que a reação catalisada não é perturbada por outras reações laterais, resultando na produção do produto final pretendido,

considerando que os subprodutos indesejáveis são eliminados. Esta reação proporciona rendimentos substancialmente mais elevados, reduzindo os custos materiais (Krajewska, 2004).

As enzimas geralmente operam em condições moderadas de temperatura, pressão e pH, com velocidades de reação da ordem das obtidas por catalisadores químicos em condições mais extremas (Krajewska, 2004; Milétic *et al.*, 2012). Isso contribui para a poupança substancial da energia do processo e para a redução dos custos de produção. Além disso, as enzimas não apresentam, praticamente, problemas de eliminação sendo estas biodegradáveis.

Este conjunto único de características vantajosas das enzimas como catalisadores tem sido explorado desde os anos de 1960 e a maioria dos processos catalisados por enzimas têm sido introduzidos com sucesso na indústria, por exemplo, na produção de alguns produtos alimentares, farmacêuticos e agroquímicos (Krajewska, 2004; Lei *et al.*, 2007a; Mateo *et al.*, 2007).

1.2.2 Efeito da temperatura e do pH na atividade enzimática

Sendo as enzimas proteínas, têm uma estrutura tridimensional característica e, ao serem submetidas a temperaturas elevadas e extremos de pH pode levar à sua desnaturação e consequente perda de atividade biológica. Por outro lado, cada enzima tem uma atividade máxima a determinados valores de temperatura e pH, os quais são denominados por temperatura ótima e pH ótimo.

A capacidade catalítica de cada enzima depende da conformação tridimensional do centro ativo. Sendo que, as enzimas são constituídas por aminoácidos (contém grupos ionizáveis), o pH influencia diretamente a ionização destes. Uma pequena alteração no pH impede que os grupos ionizáveis continuem carregados, impedindo, assim, a formação do complexo ES e consequentemente a ocorrência da reação catalítica.

Na curva da atividade de uma enzima em função do pH (Figura 4), verifica-se que, ao usar valores de pH próximos do ótimo, a atividade da enzima é menor comparativamente ao uso de um pH ótimo, contudo essa diminuição de atividade é reversível. Quando se usa valores extremos de pH, dá-se o desenrolamento irreversível da proteína (desnaturação), perdendo assim toda a sua atividade enzimática.

Contudo, é necessário salientar que, cada enzima apresenta o seu pH ótimo. (Cabral *et al.*, 2003).

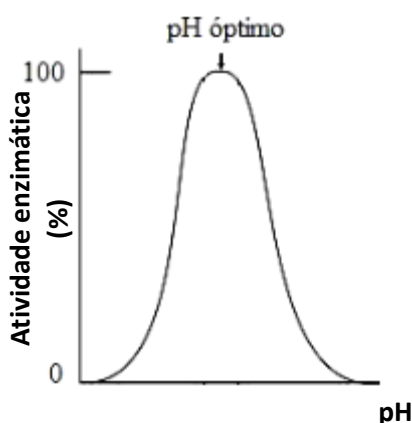


Figura 4 – Curva da atividade de uma enzima em função do pH.

É importante a nível laboratorial que se inclua em qualquer ensaio um sistema tampão, de forma a estabilizar o pH das soluções e impedir que este se altere, com o decorrer das reações. Assim, torna-se possível estudar o comportamento das enzimas a um pH estável (Cabral *et al.*, 2003).

Relativamente ao efeito da temperatura, o aumento desta origina um aumento da velocidade de reação.

O aumento da temperatura aumenta a probabilidade de colisão entre as moléculas e faz com que uma maior quantidade de moléculas tenha energia de ativação suficiente para que a reação ocorra. No entanto, tal como com o pH, cada enzima apresenta uma temperatura ótima e, a valores próximos do ótimo a atividade da enzima diminui. Temperaturas demasiado baixas ou demasiado elevadas, levam à desnaturação da enzima, perdendo, assim, toda a sua atividade irreversivelmente.

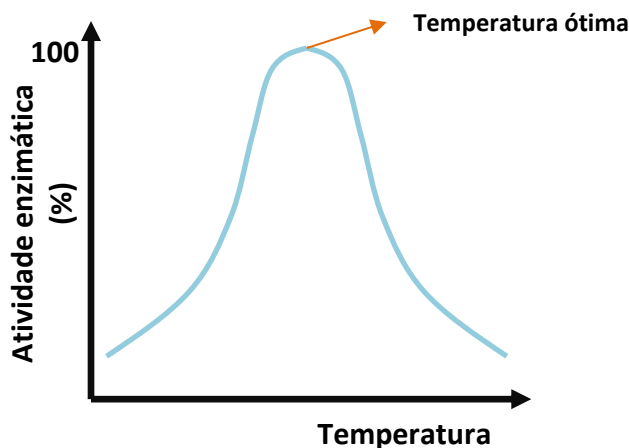


Figura 5 – Curva da atividade de uma enzima em função da temperatura (Pereira, 2010).

1.2.3 Cinética enzimática

1.2.3.1 A velocidade da reação

A velocidade de uma reação química é uma medida da conversão de reagente(s) em produto(s) por unidade de tempo. As reações químicas apresentam velocidades diferentes, avaliadas pelo consumo de reagentes ou pela variação da quantidade de produtos formados, num dado intervalo de tempo.

Nas reações catalisadas por uma enzima (E), a velocidade inicial (V_0) (declive da reta traçada na zona linear da curva) calcula-se a partir da curva de progressão de produto, como indica a Figura 6.

De acordo com a Figura 6 verifica-se que a velocidade de reação é mais acentuada no início e vai decrescendo ao longo do tempo, devido à quantidade de produto formado e à menor concentração de substrato (Cabral *et al.*, 2003).

Assim, num determinado tempo, a velocidade de reação (V) é dada pela Eq. 1.1:

$$V = \frac{\Delta P}{\Delta t} = - \frac{\Delta S}{\Delta t} \quad \text{Eq. 1.1}$$

onde ΔP corresponde à variação do produto, ΔS à variação do substrato e Δt à variação do tempo.

No caso em que são estudadas apenas as velocidades iniciais (V_0), num intervalo de tempo inicial (Δt_0), apresenta-se a Eq. 1.2:

$$V_0 = \frac{\Delta P}{\Delta t_0} \quad \text{Eq. 1.2}$$

1.2.3.2 Efeito da concentração de substrato na velocidade de reação

Numa reação enzimática, a concentração de substrato, $[S]$, afeta a velocidade da reação. À medida que se aumenta a $[S]$ a velocidade de reação tende a aumentar, obtendo-se, entre este e a velocidade inicial, uma curva hiperbólica. Assim, quando se aumenta a concentração de substrato, os valores da velocidade da reação tendem para um valor máximo, aproximando-se duma cinética de ordem zero, em que a velocidade é independente da $[S]$, como se pode verificar nas Figuras 6 e 7.

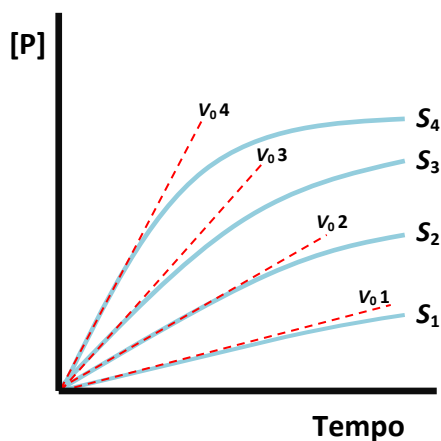


Figura 6 – Velocidades de reação enzimática com diferentes concentrações de substrato (Pereira, 2010).

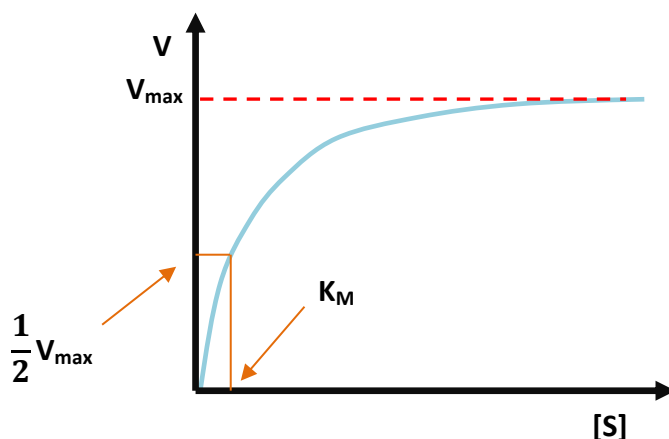


Figura 7 – Curva hiperbólica da reação enzimática.

O complexo enzima-substrato (ES) como intermediário de reações enzimáticas, ilustrado na Figura 8, é o responsável pelo perfil hiperbólico da curva Michaelis-Menten.

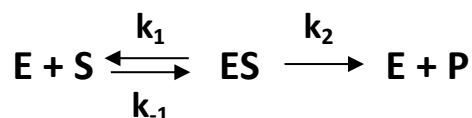


Figura 8 – Esquema de uma reação enzimática.

A teoria de Michaelis-Menten é uma simplificação, válida para a maioria das enzimas. Nos instantes iniciais da reação a quantidade de produto formada é zero. Quando a concentração de substrato torna-se suficientemente elevada, a velocidade global da reação torna-se cada vez mais insensível ao aumento da [S], aproximando-se, assim, duma assíntota (velocidade máxima - V_{\max}). Este comportamento pode ser traduzido pela Eq. 1.3 (Equação de Michaelis-Menten):

$$V = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad \text{Eq. 1.3}$$

onde K_M é a constante de Michaelis-Menten. A constante de Michaelis engloba as constantes k_1 , k_2 e k_{-1} , logo, K_M não varia com a quantidade de enzima. É, assim, uma medida da afinidade do substrato em relação à enzima, ou seja, quanto maior o seu valor menor será a afinidade.

Para elevadas concentrações de substrato, a soma da constante com a concentração de substrato equivale praticamente à própria $[S]$ e, substituindo na equação de Michaelis-Menten ($[S] + K_M$) por $[S]$ verifica-se que $V = V_{\max}$, ou seja, a velocidade da reação torna-se independente do aumento de concentração do substrato. Isto corresponde à situação experimental em que todos os centros ativos das moléculas de enzima estão saturados de substrato.

Quando K_M iguala a $[S]$, verifica-se que a velocidade da reação corresponde a metade da V_{\max} . Posto isto, pode-se afirmar que a eficiência catalítica máxima de uma enzima é atingida a uma baixa concentração de substrato, quando o valor da constante de Michaelis-Menten é baixo (Cabral *et al.*, 2003).

1.2.4 Enzimas pectolíticas

A adição de enzimas pectolíticas (pectinases), resulta na degradação da pectina (bem como de outros componentes de alto peso molecular) (Kashyap *et al.*, 2001; de Gregorio *et al.*, 2002; Jayani *et al.*, 2005). Estas enzimas atuam apenas nas regiões de homogalacturonana e ramnogalacturonana das pectinas (Alimardani-Theuil *et al.*, 2011). As pectinases expõem parte das cargas positivas da proteína e reduzindo, assim, a repulsão electrostática entre as partículas o que provoca a aglomeração das mesmas, formando-se partículas maiores. Eventualmente estas partículas maiores depositam, mas para melhorar o processo, podem ser adicionados agentes floclulantes (clarificantes) como a gelatina, taninos e bentonite (tipo de argila). Leveduras e outros microrganismos, que podem ter contaminado o sumo, também são precipitados pelos clarificantes. Obtém-se, então, um sumo transparente mas nem por isso clarificado. Uma segunda centrifugação e subsequente filtração são necessárias para dar a clareza ao sumo, sendo que esta é apreciada pelos consumidores (Kashyap *et al.*, 2001). As pectinases permitem assim diminuir a viscosidade, aumentando consequentemente o rendimento dos sumos, melhorar a sua aparência e reduzir o tempo de filtração (Alkorta *et al.*, 1998; Fernández-González *et al.*, 2004). Outra aplicação das enzimas pecticas é o tratamento seletivo dos concentrados com endo-poligalacturonase (endo-

PG) para provocar a hidrólise limitada das pectinas de modo a reduzir a viscosidade (sumos cítricos tendem a gelificar quando concentrados) (Alkorta *et al.*, 1998).

As pectinases são produzidas por plantas e microrganismos como fungos, leveduras e bactérias (Alimardani-Theuil *et al.*, 2011), sendo que os fungos são geralmente usados como fontes das preparações comerciais. O género *Aspergillus spp.* é uma das espécies frequentemente usadas nas indústrias de sumos pela sua alta atividade pectolítica exibida (Alkorta *et al.*, 1998; Kashyap *et al.*, 2001; Fawote e Odunfa, 2003; Plaza *et al.*, 2008).

A classificação destas enzimas é baseada no modo de ação nos polímeros pécticos. Estas são classificadas segundo 3 grupos: as protopectinas, as esterases (pectinesterases - PE) e as despolimerases (hidrolases e liases) (Jayani *et al.*, 2005), como indica a Figura 9:

- I) Protopectinases: são enzimas que degradam a protopectina insolúvel originando a pectina polimerizada altamente solúvel.
- II) Esterases: catalisam a desesterificação da pectina por remoção do grupo metoxilo, formando-se ácido péctico. A enzima atua preferencialmente no grupo metil éster da unidade de galacturonato invés da unidade de glacturonato não esterificada (Kashyap *et al.*, 2001).
- III) Despolimerases: catalisam a quebra das ligações glicosídicas α (1 \rightarrow 4) entre os monómeros de ácido D-galacturónico das substâncias pécticas. Neste grupo inserem-se: Polimetilgalacturonases (PMG), Poligalacturonases (PG), Polimetilgalacturonato liases (PMGL) e Poligalacturonato liases (PGL) (Kashyap *et al.*, 2001).

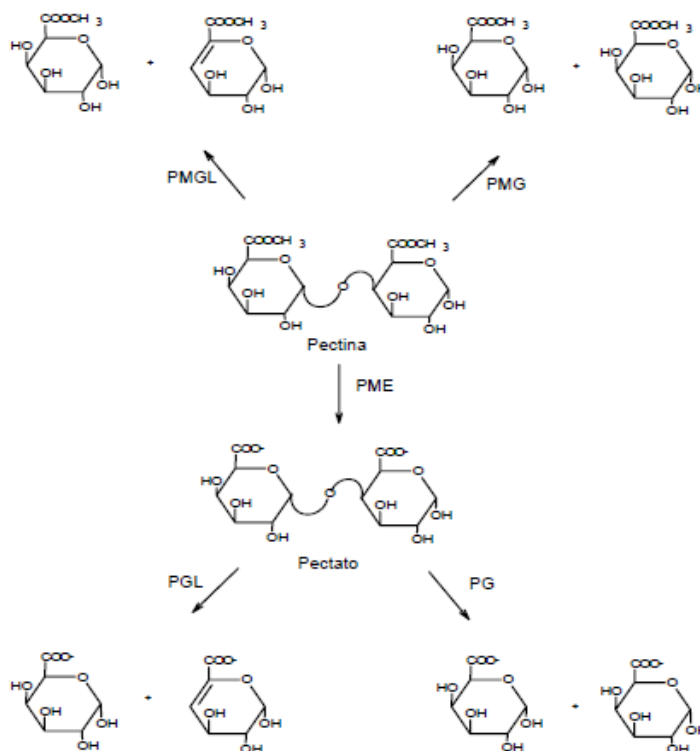


Figura 9 – Modo de ação enzimática das pectinases numa molécula de pectina (Alkorta *et al.*, 1998).

Relativamente às suas aplicações, existem dois tipos de pectinases: as acídicas e as alcalinas.

As enzimas pécticas acídicas, usadas nas indústrias de sumos de fruta e na produção de vinho, provem frequentemente de fontes fúngicas, especialmente de *Aspergillus niger*. Os sumos produzidos por estas indústrias incluem comercialmente:

- I) Sumos clarificados gaseificados (maçã, pera e uva);
- II) Sumos com turbidez (sumos citrinos, sumo de ameixa, sumo de tomate e néctares);
- III) Produtos unicelulares, em que a intenção é preservar a integridade das células das plantas por hidrólise seletiva de polissacáridos da lamela média.

O objetivo da adição das enzimas difere nestes 3 tipos de sumos de fruta e vegetais (Kashyap *et al.*, 2001).

As pectinases alcalinas são usadas principalmente na degomagem e na maceração de plantas têxteis e no pré-tratamento das águas residuais pécticas nas

indústrias de sumo de fruta. Estas enzimas provem principalmente de fontes bacterianas, como *Bacillus spp* (Kashyap *et al.*, 2001).

Sendo este trabalho realizado em torno de um sumo citrino, nomeadamente de laranja (usando-se, então, pectinases acídicas), torna-se necessário salientar as características deste fruto.

Contrariamente à pectina da maçã, que é altamente metilada, a pectina da laranja é apenas parcialmente metilada. Assim é porque o sumo de laranja contém naturalmente grandes quantidades de pectinesterase (polimetilgalacturonato esterase – PMGE (Uenojo *et al.*, 2007)), uma enzima que tira os grupos metoxilo das moléculas de pectina. Na presença de iões cálcio, forma-se pectato de cálcio insolúvel no sumo de laranja levando à indesejável precipitação das partículas que conferem turbidez. São amplamente empregues dois métodos para prevenir a perda de turbidez desejada: o primeiro é desnaturar a pectinesterase aquecendo o sumo. Infelizmente este processo deteriora o sabor. A alternativa é congelar o concentrado de sumo de forma a inativar a enzima. Os sumos são muitas vezes vendidos assim, contudo apresentam custos elevados no transporte e armazenamento (Kashyap *et al.*, 2001).

No processo de extração de sumo de laranja, as pectinases podem ser adicionadas em duas fases do processo (Figura 10):

- No final da extração da polpa lavada, para diminuir a viscosidade;
- Após a extração final, para aumentar a libertação de açúcares e sólidos solúveis.

O tratamento enzimático melhora a estabilidade da turvação pois, a degradação da pectina é limitada. Ou seja, há diminuição da viscosidade mas sem afetar a pectina insolúvel, responsável por manter a estabilidade da turbidez. É muito importante usar, se possível, pectinases com baixa atividade de PME, evitando a clarificação do sumo extraído da polpa (Kashyap *et al.*, 2001).



Figura 10 – Adição das pectinases em diferentes fases do processo de produção de sumos de fruta (Prathyusha e Suneetha, 2011).

1.3 Imobilização das enzimas pectolíticas

1.3.1 Enzima nativa *versus* Enzima imobilizada

Apesar das excelentes propriedades da pectinase, as enzimas nativas como biocatalisadores apresentam sempre alguns inconvenientes, como a baixa estabilidade nas condições operacionais, dificuldade de recuperação do produto e, a impossibilidade de reutilizações múltiplas num processo industrial (Sheldon, 2007; Lei e Jiang, 2011). Para superar estes problemas, foi incluída a imobilização de enzimas, a fim de melhorar as características catalíticas contra várias formas de desnaturação bem como para tornar o uso de enzimas dispendiosas economicamente viável, através da sua recuperação e posterior reutilização (Jin e Brennan, 2002; Mateo *et al.*, 2007; Vila-Real *et al.*, 2010; Lei e Jiang, 2011), bem como de melhorar o sabor do produto (Alkorta *et al.*, 1998). Contudo, quando se assume a reutilização da enzima significa que a estabilidade da preparação enzimática final tem que ser elevada o suficiente para permitir a sua reutilização. Portanto a enzima tem que ser muito estável ou tornar-se altamente estável durante o processo de imobilização (Mateo *et al.*, 2007).

O resultado final é uma enzima aprisionada com elevada atividade, boa acessibilidade ao substrato e estabilidade a longo prazo acoplada a uma elevada resistência contra a lixiviação (Jin e Brennan, 2002; Vila-Real *et al.*, 2010).

1.3.2 Métodos de imobilização

A técnica de imobilização de enzimas tem-se revelado nos últimos tempos como uma ferramenta muito poderosa para melhorar quase todas as propriedades da enzima, se devidamente elaborada: estabilidade, atividade específica, seletividade e redução da inibição. É necessário ter em conta, também, que a sua utilização final será como catalisador industrial logo, os processos ideais de imobilização devem limitar o uso de reagentes tóxicos ou altamente instáveis (Mateo *et al.*, 2007).

Os métodos de imobilização de enzimas podem ser classificados de acordo com o tipo de ligação que ocorre na reação química, designada ligação covalente e não covalente, e inclusão (Tabela 3) (Vila-Real *et al.*, 2010; Milétic *et al.*, 2012).

Tabela 3 – Métodos de imobilização de enzimas (Milétic *et al.*, 2012).

Ligação covalente	Ligação com materiais de suporte pré-fabricados. Reticulação (<i>cross-linking</i>).
Ligação não-covalente	Ligação adsortiva ou iónica para materiais de suporte. Cristalização da enzima. Dispersando enzimas (p.ex. pós de enzima secos em solventes orgânicos).
Inclusão	Incorporação em redes poliméricas. Incorporação num dispositivo de membrana. Inclusão num dispositivo de membrana.

Neste trabalho é dada especial importância ao método de inclusão. Este método envolve a retenção da enzima dentro de uma fibra vazia ou de uma rede polimérica. Uma das principais vantagens deste método é a ausência de derivatização da enzima, bem como a ausência de uma barreira entre superfícies. Contudo, os efeitos internos de transferência de massa podem provocar efeitos de partição e difusão, enquanto que os efeitos externos de transferência de massa dependem da camada fora do suporte (Vila-Real *et al.*, 2010).

1.3.3 Vantagens do processo de imobilização

Tendo em conta tudo o que foi afirmado anteriormente, enumeram-se, de seguida, as principais vantagens da imobilização (Takei *et al.*, 2011; Milétic *et al.*, 2012):

- Proteger de condições adversas como variações de temperatura, pH, presença de solventes orgânicos e compostos tóxicos;
- Melhorar a estabilidade a longo prazo;
- Aumentar a densidade da enzima;
- Reduzir a contaminação por microorganismos estranhos;
- Aumentar a enantiosseletividade;
- Permitir a recuperação da enzima por filtração ou centrifugação;
- Permitir a reutilização das enzimas mesmo nouro tipo de reação.

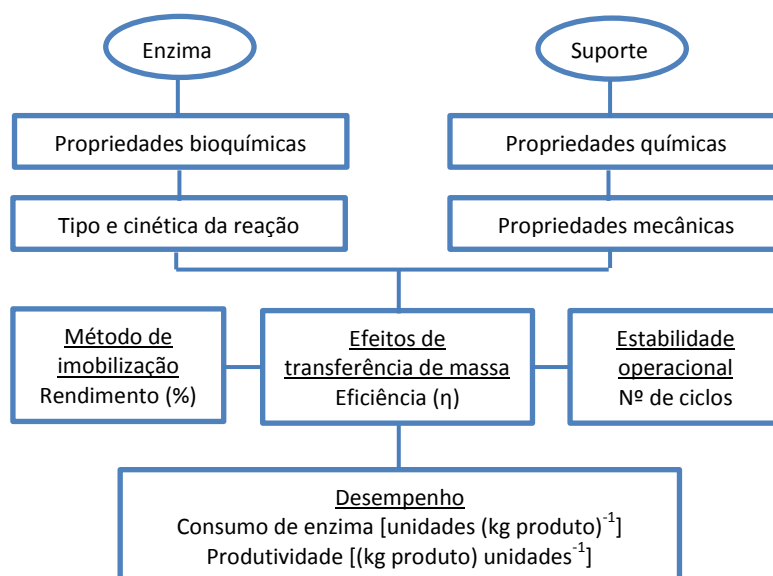


Figura 11 – Caraterísticas da enzima imobilizada (Tischer e Wedekind, 1999).

As propriedades das preparações da enzima imobilizada são estabelecidas pelas propriedades tanto da enzima como do material de suporte. A interação entre os dois origina uma enzima imobilizada com propriedades químicas, bioquímicas, mecânicas e cinéticas específicas (Milétic *et al.*, 2012) (Figura 11), que podem ser decisivas para a sua aplicação prática e, assim um suporte criteriosamente selecionado pode melhorar

significativamente o desempenho operacional do sistema imobilizado (Krajewska, 2004).

As propriedades bioquímicas da enzima, como a sua massa molecular, os grupos funcionais na superfície e a sua pureza são fatores importantes para a imobilização. Os grupos funcionais na superfície da enzima, por exemplo, dão a informação de que tipo de interações se pode desenvolver entre o suporte e a enzima. Também a pureza da enzima é importante, uma vez que as impurezas podem interferir com os substratos. Outras características da enzima que determinam os parâmetros da enzima imobilizada são o tipo e cinética da reação que é catalisada pela enzima. A atividade específica, os parâmetros cinéticos para ativação ou inativação e estabilidade face ao pH, temperatura, solventes e impurezas também têm impacto na enzima imobilizada (Milétić *et al.*, 2012).

As características do material de suporte também influenciam as propriedades da enzima imobilizada. Uma das características mais importantes do suporte é a estrutura química que irá determinar a interação com as enzimas. Se o suporte for altamente poroso, o tamanho do poro e a distribuição dos poros irá desempenhar um papel importante na determinação das propriedades da enzima imobilizada. Se o poro for pequeno pode provocar uma limitação na difusão resultando num rearranjo das enzimas e sua subsequente inatividade. Contudo, para poros muito grandes, as enzimas podem-se aglomerar e, assim, perder atividade.

As propriedades mecânicas do material de suporte são cruciais na aplicação da enzima imobilizada. Quando a enzima imobilizada é colocada num tanque de agitação, o suporte tem que ter outras propriedades comparando com a colocação da mesma numa coluna. Num tanque de agitação, o material de suporte tem que ser resistente à abrasão, enquanto que numa coluna, este tem que ter alguma resistência ao fluxo (Milétić *et al.*, 2012).

Embora se reconheça que não há um suporte universal para todas as enzimas e suas aplicações, um certo número de características desejáveis devem ser comuns a qualquer material considerado para imobilizar enzimas (Krajewska, 2004):

- Elevada afinidade com as proteínas;

- Disponibilidade dos grupos funcionais reativos para reações diretas com as enzimas e para modificações químicas;
- Hidrofilicidade;
- Estabilidade mecânica e rigidez;
- Regenerabilidade;
- Fácil preparação em diferentes configurações geométricas que forneça um sistema com permeabilidade e área superficial adequada para a biotransformação escolhida;
- Biodegradabilidade;
- Económico.

Quando as características da enzima e do suporte estão combinadas, algumas outras características também influenciam as propriedades da enzima imobilizada.

O método de imobilização e a otimização das condições de imobilização são também cruciais para as propriedades do biocatalisador (pH, temperatura, tempo de imobilização, etc.), e devem ser escolhidos com especial atenção.

A velocidade da reação da enzima imobilizada é grandemente influenciada pelos efeitos de transferência de massa pois, está ligada ao suporte tendo uma mobilidade restrita considerada. Isto também pode afetar a mobilidade dos solutos. Os solutos podem ser adsorvidos ao suporte resultando na redução da mobilidade o que causa uma diminuição da velocidade da reação comparando com as enzimas solúveis (Milétic *et al.*, 2012).

1.3.4 Quitosano – Suporte de imobilização

As enzimas podem ser imobilizadas em vários suportes e por diferentes métodos. Para fins práticos, são utilizados principalmente grânulos de tamanho na gama do milímetro. Contudo, são relatados cada vez mais casos de imobilização de enzimas em micropartículas possuindo uma área de superfície específica elevada e numerosos locais ativos disponíveis para fixar as moléculas de enzima. Além disso, devido ao menor tamanho das partículas de suporte, o impedimento da difusão

interna diminui. Assim sendo, o suporte de imobilização deve ser escolhido deliberadamente (Biró *et al.*, 2008).

Uma vasta gama de diferentes materiais pode ser utilizada como suporte de imobilização: suportes inorgânicos (maior estabilidade que suportes orgânicos), suportes orgânicos de fontes naturais (boa compatibilidade com as enzimas) e suportes orgânicos sintéticos (suportes personalizados) (Milétic *et al.*, 2012).

As macromoléculas naturais (suportes orgânicos de fontes naturais), como o quitosano, a celulose, agarose e carragenina, com excelente biocompatibilidade e hidrofiliabilidade, são consideradas suportes apropriados para imobilização de enzima desde que não apresentem toxicidade, que sejam baratos e que tenham afinidade para com a proteína (Lei e Bi, 2007). Contudo, é importante referir que, estas moléculas naturais apresentam uma fraca estabilidade mecânica e as ligações geradas são pobres (Milétic *et al.*, 2012).

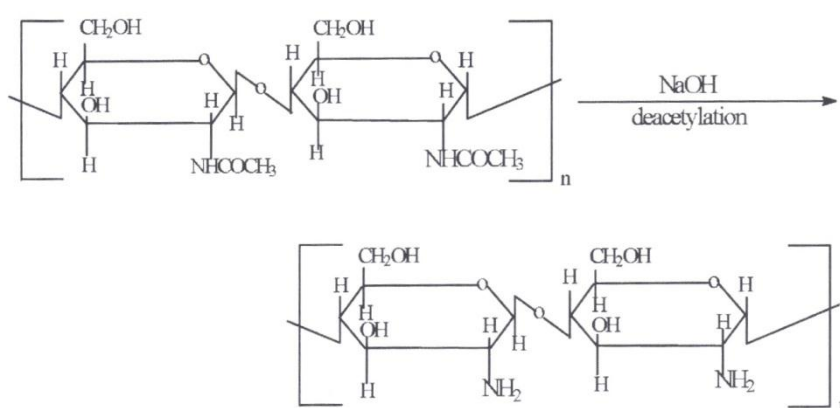


Figura 12 – Formação do quitosano por N-deacetilação da quitina (Kumar, 2000).

De muitos dos suportes que foram considerados e estudados para a imobilização de enzimas, a quitina e o quitosano são interessantes na medida em que oferecem a maioria das características desejáveis de um suporte, referidas anteriormente (Krajewska, 2004).

Neste estudo, os ensaios de imobilização foram realizados com o quitosano como suporte.

O quitosano (Figura 12) é um polissacárido natural, o principal derivado da quitina, obtido por N-deacetilação (Kumar, 2000; Krajewska, 2004; Chen *et al.*, 2006) em graus variáveis que é caracterizado pelo grau de deacetilação e é, consequentemente, um copolímero composto por unidade de N-acetil-D-glucosamina e D-glucosamina (Dash *et al.*, 2011). A quitina e o quitosano podem ser considerados quimicamente como análogos da celulose (Figura 13), em que o grupo hidroxilo do C2 foi substituído pelos grupos acetamida e amina, respetivamente. O quitosano é insolúvel em água, mas na presença de grupos amina torna-se solúvel em soluções ácidas abaixo do pH 6.5 (Krajewska, 2004).

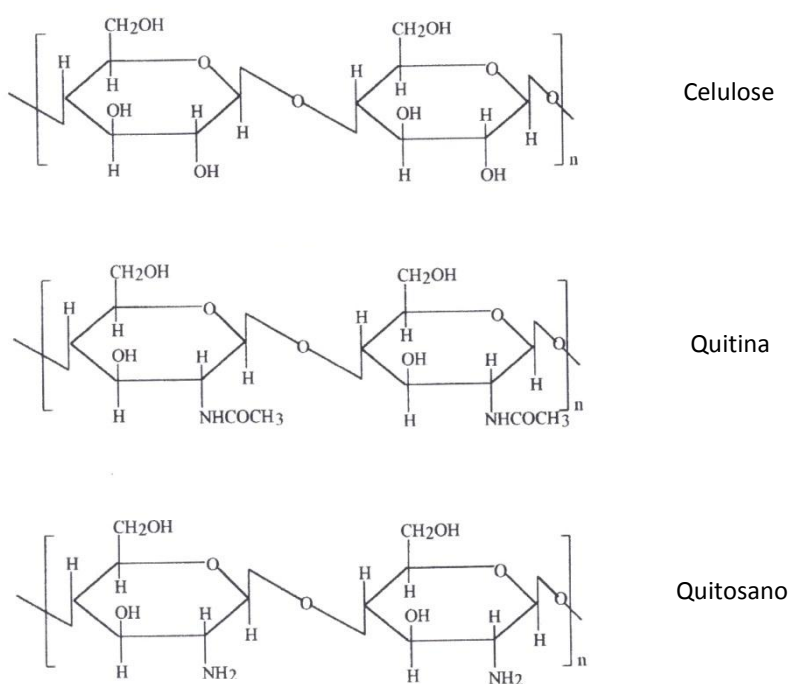


Figura 13 – Estrutura molecular da celulose, quitina e quitosano (Kumar, 2000).

A quitina e o quitosano são obtidos, a relativamente baixo custo, de exoesqueletos de insetos, determinados fungos e, principalmente, de crustáceos (Dash *et al.*, 2011). Basicamente, o processo consiste na desproteínização do material da casca com uma solução diluída de NaOH e descalcificação com uma solução diluída de KCl. Para resultar em quitosano, a quitina obtida é sujeita a uma N-deacetilação por tratamento com uma solução de NaOH a 40-45%, seguida de procedimentos de purificação (Krajewska, 2004).

O quitosano possui propriedades químicas e biológicas distintas. Nas suas cadeias lineares de poliglucosamina de alto peso molecular, o quitosano tem grupos amina e hidroxilo reativos, passíveis de modificações químicas. Adicionalmente, os grupos amina tornam o quitosano um polieletrólito catiónico ($pK_a \approx 6,5$), um dos poucos encontrados na natureza. Esta alcalinidade dá ao quitosano propriedades singulares: o quitosano é solúvel em meio ácido aquoso com $pH < 6,5$ e quando dissolvido dispõe de uma elevada carga positiva nos grupos NH_3 , ele adere a superfícies carregadas negativamente, agrega com compostos polianiónicos, e quelata iões de metais pesados (Krajewska, 2004; Lei e Bi, 2007). A solubilidade em soluções ácidas e a agregação com polianióes concede à quitosana excelentes propriedades na formação de gel (Krajewska, 2004).

Juntamente com propriedades biológicas únicas que incluem biodegradabilidade, biocompatibilidade para produtos inofensivos, não toxicidade (Kumar, 2000; Dutta, *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2006), inércia fisiológica, afinidade notável para proteínas, propriedades hemostáticas, fungistáticas, antitumorais e antiolesterémicas, o quitosano oferece um potencial extraordinário num amplo espectro de aplicações. Como biopolímero biodegradável, é considerado um “amigo” ecológico, seguro para o homem e para o meio ambiente (Krajewska, 2004; Dash *et al.*, 2011).

A preparação dos géis de quitosano é um considerado um processo simples na medida em que, é facilmente dissolvido em soluções diluídas da maioria dos ácidos orgânicos, incluindo os ácidos fórmico, acético, tartárico e cítrico, formando soluções viscosas que precipitam mediante um aumento de pH e formando complexos ionotrópicos insolúveis em água com polieletrólitos aniónicos. Desta forma os géis de quitosano podem ser fabricados na forma de esferas, membranas, revestimentos, cápsulas, fibras, fibras ocas e esponjas (Krajewska, 2004) e, apresentar vários tamanhos. O quitosano tornou-se, então, frequentemente usado como material de suporte para a imobilização de enzimas (Biró *et al.*, 2008).

Os métodos de preparação do gel de quitosano podem-se dividir em quatro grupos: método de evaporação do solvente, método de neutralização (precipitação),

método *cross-linking* (reticulação) e método de gelificação ionotrópica (Krajewska, 2004; Biró *et al.*, 2008). Os grupos reativos amina e hidroxilo (depois das modificações químicas) tornam possível o acoplamento das enzimas (Krajewska, 2004), tornando possível a elevada recuperação da atividade das mesmas permitindo, assim, que a enzima imobilizada permaneça consideravelmente ativa (Lei e Bi, 2007).

O método de preparação das esferas de quitosano selecionado para a realização deste trabalho foi o método de precipitação. Este método consiste na mistura da solução ácida de quitosano com uma solução alcalina, levando ao aumento do pH e resultando na precipitação do quitosano. Este método é usado para produzir precipitados de quitosano em forma de membranas, fibras mas, principalmente, esferas de diferentes tamanhos e porosidades.

As esferas são obtidas adicionando gotas de solução de quitosano a uma solução de NaOH frequentemente preparada com solução aquosa de etanol, onde o etanol, não sendo um solvente para o quitosano, facilita a solidificação das esferas de quitosano. Após a preparação, as esferas são geralmente sujeitas ao *cross-linking* como método complementar (Krajewska, 2004). Este método complementar confere vantagens mecânicas tanto ao suporte como à enzima, tornando-os mais fortes e robustos (Lei e Jiang, 2011). A imobilização de enzimas é alcançada pela ligação na superfície do gel por adsorção, reticulação ou ligação covalente, ou por inclusão se a enzima está dissolvida na solução inicial do quitosano (Krajewska, 2004).

O quitosano pode ser facilmente reticulado por reagentes como glutaraldeído ou o glioxal (agentes de reticulação mais comuns (Gupta e Jabrail, 2006)), para formar aquagéis rígidos (Lei e Bi, 2007).

O glutaraldeído é usado como agente de ativação e agente de reticulação, na fase de *cross-linking*. Isto deve-se à sua fiabilidade e facilidade de utilização, mas mais importante ainda, devido à disponibilidade de grupos amina para a reação do glutaraldeído, não só com as enzimas, mas também com o quitosano (Krajewska, 2004; Mateo *et al.*, 2007). Contudo, o glutaraldeído é conhecido por ser tóxico, o seu destino no organismo humano não está totalmente esclarecido (Gupta e Jabrail, 2006).

1.4 Alta Pressão como Processo Tecnológico

Os consumidores exigem, cada vez mais, degustar alimentos frescos de alta qualidade, livres de aditivos, microbiologicamente seguros e com uma vida útil prolongada (De Roeck *et al.*, 2009). Assim sendo, os géneros alimentícios vegetais são sujeitos a processamentos de forma a aumentar a sua comestibilidade e palatabilidade. O processamento, também, visa prolongar o tempo de prateleira, mantendo o máximo possível as propriedades organoléticas e nutricionais originais, dentro dos limites apresentados para a segurança microbiana (Oey *et al.*, 2008b). Para atingir o equilíbrio entre a qualidade e segurança alimentar, há a necessidade de otimizar técnicas convencionais de processamento atualmente aplicadas nas indústrias alimentares (p. ex. pasteurização térmica) e desenvolver novas técnicas de processamento como o processamento a Alta-Pressão (AP) (Oey *et al.*, 2008b; Timmermans *et al.*, 2011).

A cor, o flavor e a textura são características de qualidade importantes das frutas e vegetais e os principais fatores que afetam a perceção sensorial e a aceitação dos produtos por parte do consumidor (Oey *et al.*, 2008b). O método mais comum de conservação de alimentos é o processamento térmico. Contudo, estes processos afetam adversamente as qualidades organoléticas, texturais e nutricionais. O processamento a pressões elevadas tem mostrado ser uma tecnologia com grande potencial (De Roeck *et al.*, 2009).

O processamento a AP pode preservar o valor nutricional (Oey *et al.*, 2008a) e as propriedades sensoriais das frutas e vegetais (De Roeck *et al.*, 2009) devido ao seu efeito limitado nas ligações covalentes dos compostos de baixa massa molecular como os compostos da cor e do flavor. Contudo, os géneros alimentícios são sistemas complexos e os compostos responsáveis pelas propriedades sensoriais coexistem com as enzimas, iões metais, etc.. Durante o processamento a AP (100 – 1000 MPa/ - 20°C a 60 °C) pode ocorrer simultaneamente (Oey *et al.*, 2008b):

- a disrupção da parede celular e da membrana;
- processos de conversão da enzima catalisada;
- reações químicas;

- a modificação de biopolímeros como a inativação da enzima, desnaturação da proteína e formação de gel.

Comparando com o tratamento térmico à pressão atmosférica, a grande vantagem do tratamento a AP é que essa pressão é aplicada em todas as direções e de forma homogénea independentemente do volume e geometria do produto (Lei de Pascal) (Oey *et al.*, 2008a; De Roeck *et al.*, 2009). Contudo, é necessário ter em conta que, um aumento ou diminuição da pressão está associada a uma proporcional alteração de temperatura. A eficácia do tratamento a AP tanto na qualidade como na segurança dos géneros alimentícios não é apenas influenciada por fatores extrínsecos como o tempo de tratamento, o grau de compressão/descompressão, os níveis de temperatura-pressão, mas também por fatores intrínsecos como a composição do género alimentício e do estado fisiológico dos micro-organismos (Oey *et al.*, 2008a).

Durante o processamento a AP, podem ser usadas diferentes combinações de pressão e temperatura para atingir efeitos desejados na textura, cor e flavor dos géneros alimentícios. A qualidade dos frutos e vegetais processados a AP pode, contudo, alterar durante o armazenamento devido à coexistência de reações químicas, como a oxidação, e reações bioquímicas quando enzimas endógenas ou micro-organismos não estão completamente inativados (Oey *et al.*, 2008b).

Para controlar/avaliar este processo, além de outras análises como a determinação do ácido ascórbico ou a medição da cor, faz-se a determinação da atividade catalítica durante os tratamentos de pressão-temperatura, quantificando os produtos da reação de conversão da pectina. No caso da PME, a atividade catalítica é medida através da produção de metanol por desmetoxilação da pectina (Eisenmenger e Reyes-De-Corcuera, 2009), no caso da PG a atividade catalítica é medida pela formação de grupos redutores durante o tratamento térmico ou tratamento de pressão-temperatura (Sila *et al.*, 2008).

1.4.1 O efeito do processamento a Alta-Pressão na cor

O tratamento a AP (a temperaturas baixas e moderadas) tem um efeito mínimo nos pigmentos (p. ex. clorofila, carotenoides, antocianinas, etc.) responsáveis pelas cores dos frutos e vegetais. Os compostos da cor dos frutos e vegetais processados a AP podem, contudo, alterar durante o armazenamento devido à incompleta inativação das enzimas e micro-organismos, que pode resultar em reações químicas indesejáveis (tanto enzimáticas como não enzimáticas) na matriz do género alimentício (Oey *et al.*, 2008b).

Os carotenoides são importantes para a aparência amarela, laranja e vermelha dos frutos e vegetais e, são estáveis à pressão. O tratamento a AP aumenta o rendimento da extração de carotenoides da matriz (Butz *et al.*, 2003).

O oxigénio tem um papel importante na degradação do ácido ascórbico (AA) (protetor do escurecimento enzimático) tanto à pressão atmosférica como a pressões elevadas. A degradação do AA está limitada pelo decréscimo da concentração de oxigénio inicial. Por outras palavras a estabilidade do AA é dependente da razão molar das concentrações da vitamina e do oxigénio. O AA é instável a níveis de pressão elevadas, combinados de temperaturas elevadas (acima dos 65 °C) e a maior degradação é provocada pela oxidação especialmente durante o aquecimento. Portanto, eliminando o conteúdo em oxigénio no acondicionamento pode diminuir a degradação dos AA durante o processamento e subsequentemente armazenamento (Oey *et al.*, 2008a).

Durante o armazenamento (2 - 4 °C), ocorre descoloração dos géneros alimentícios tratados a alta pressão devido à ação da polifenoloxidase. Esta enzima catalisa a oxidação dos compostos fenólicos a quinonas, originando o escurecimento dos géneros alimentícios, designado por escurecimento enzimático (Eisenmenger e Reyes-De-Corcuera, 2009; Oey *et al.*, 2008b; Timmermans *et al.*, 2011).

A adição de ácido ascórbico e cisteína ajuda a inibir a atividade desta enzima, resultando num menor escurecimento. Contudo, o tratamento a alta pressão potencia a capacidade inibitória do ácido ascórbico e da cisteína (Oey *et al.*, 2008b).

Num estudo feito em sumo de laranja, a alteração de cor (baseada nos valores L^* , a^* , b^*) apresenta uma correlação linear com a perda de ácido ascórbico durante o armazenamento, mas esta correlação não está dependente do tipo de processamento (comparação entre a temperatura de pasteurização e o tratamento a AP). Um aumento da temperatura de armazenamento resulta num maior escurecimento do sumo (Polydera *et al.*, 2005; Timmermans *et al.*, 2011).

1.4.2 O efeito do processamento a Alta-Pressão na textura

As alterações da textura nos frutos e vegetais podem estar relacionadas a transformações nas paredes celulares dos polímeros devido a reações enzimáticas e não enzimáticas (Sila *et al.*, 2008). Devido à disrupção da célula, o processamento a AP facilita a ocorrência de reações enzimáticas e não enzimáticas. Os substratos, iões e enzimas que estão localizados em diferentes compartimentos nas células podem ser libertados e interagirem uns com os outros durante o tratamento a AP. Ao mesmo tempo, a pressão pode melhorar a ação da PME, baixar a atividade da PG (ocorrendo principalmente a temperaturas moderadas), e retardar a β -eliminação, reação em que há perda de dois substituintes dos átomos adjacentes, como o carbono, azoto e oxigénio, resultando numa nova ligação insaturada (possível de ocorrer a temperaturas elevadas) (Oey *et al.*, 2008b).

As pectinases apresentam diferentes estabilidades à pressão e temperatura. Como consequências, diferentes combinações de temperatura e pressão podem ser usadas para inativar algumas pectinases específicas (p. ex. a PME) durante o processamento para alterar a textura, que não é possível usando apenas processos térmicos (Oey *et al.*, 2008b). Além disso o processamento a AP pode ser combinado com pré tratamentos como a adição de pectinases exógenas (Fraeye *et al.*, 2010).

O tratamento a AP pode, também, afetar as propriedades reológicas dos géneros alimentícios como purés, polpas e sumos de frutos e vegetais. Os efeitos observados estão dependentes das condições do processo de AP e do tipo de fruta e vegetal. Isto é, para cada tipo destes géneros alimentícios, o aumento da pressão pode provocar o aumento ou diminuição da viscosidade (Oey *et al.*, 2008b).

Para alguns sumos de fruta, a estabilidade da turbidez é um aspeto de qualidade importante. Um estudo do tempo de prateleira do sumo de laranja (Polydera *et al.*, 2005) mostrou que o tratamento a AP (600 MPa/40 °C/4 min) resultou numa maior viscosidade que o tratamento térmico (80 °C/60 seg) e que, durante o armazenamento, o sumo tratado a AP apresentou uma perda limitada de turbidez e uma pequena diminuição da viscosidade, mesmo a temperaturas de armazenamento elevadas (30 °C). É sugerido que a atividade da PME residual é responsável pela perda de qualidade do sumo de laranja durante o armazenamento (Oey *et al.*, 2008b; Duvetter *et al.*, 2009; Timmermans *et al.*, 2011).

A pressão e a temperatura exibem um efeito antagonista na estabilidade das PME, a pressões moderadas (≤ 300 MPa). Por outras palavras, pressões moderadas retardam a inativação térmica das PME. Além disso, algumas das PME não perdem atividade com tratamentos acima dos 900 MPa (Sila *et al.*, 2008).

1.4.3 O efeito do processamento a Alta-Pressão no flavor

O flavor é a impressão sensorial do género alimentício que é determinada principalmente pelas sensações químicas do sabor e do cheiro. A língua humana consegue distinguir apenas cinco qualidades distintas de sabor, das quais o azedo, o doce e o amargo, que são os mais importantes relacionados com o flavor dos frutos e vegetais. O nariz humano, por outro lado, consegue distinguir um vasto número de compostos voláteis, mesmo em quantidades mínimas. Quaisquer alterações nos compostos responsáveis pelo azedo, doce e amargo ou no odor dos frutos e vegetais, pode resultar em mudanças no seu flavor (Oey *et al.*, 2008b).

Geralmente assume-se que o flavor fresco de frutos e vegetais não é alterado pelo processamento a AP (200 – 600 MPa à temperatura ambiente), uma vez que a estrutura dos pequenos compostos moleculares do flavor não são diretamente afetados pela pressão elevada.

Como o processamento a AP pode melhorar e retardar as reações químicas e enzimáticas, que pode alterar indiretamente o conteúdo de alguns compostos do flavor e perturbar o equilíbrio da composição do flavor nos frutos e vegetais. Como

consequência, o processamento a AP pode resultar em alterações indesejáveis do flavor (Oey *et al.*, 2008b).

Baseado na avaliação sensorial, o flavor do sumo de fruta tratado a AP não é tão fresco como o sumo de fruta que não foi submetido a qualquer tratamento (Oey *et al.*, 2008b). Contudo, comparativamente ao sumo de fruta sujeito a pasteurização, o sumo que sofreu o tratamento a AP apresenta um flavor mais agradável (Polydera *et al.*, 2003; Polydera *et al.*, 2005; Timmermans *et al.*, 2011).

Na maioria das investigações, o tratamento a AP foi realizado à temperatura ambiente (Oey *et al.*, 2008b). O processamento a AP, quando realizado à temperatura ambiente, é um dos processos não termais que inativa as células bacterianas, leveduras e bolores, sem o uso de temperaturas elevadas, havendo um efeito mínimo nas qualidades sensoriais na textura, cor e sabor (Bull *et al.*, 2004).

O processamento a AP usa, normalmente pressões que rondam os 300 – 700 MPa por períodos de 30 segundos a alguns minutos de forma a destruir as bactérias patogénicas e resíduos (Sila *et al.*, 2008; Timmermans *et al.*, 2011). Este processamento realizado à temperatura ambiente não resulta necessariamente na inativação dos esporos bacterianos e enzimas resistentes à pressão, o que pode levar à deterioração do produto, durante o armazenamento. Portanto, é necessária uma câmara frigorífica para preservar a elevada qualidade do produto (Oey *et al.*, 2008b), ou diminuir o pH do produto (Timmermans *et al.*, 2011) pela adição de ácido ascórbico, por exemplo.

É necessário, também, ter em atenção que as enzimas, como outras proteínas, são estáveis numa certa combinação de pressão-temperatura. Excedendo estes limites há uma perturbação das forças que estabilizam a estrutura tridimensional da proteína, provocando o desdobramento e a desnaturação da molécula e, conseqüentemente, a sua inativação (Sila *et al.*, 2008).

Capítulo 2 Objetivos

2. Objectivos

O objetivo principal deste trabalho foi estudar a ação conjugada de pectinases e da tecnologia de alta pressão no tratamento de sumos e, aliar a estes dois processos a pasteurização, de forma a obter um sumo clarificado e isento de microrganismos.

Os objetivos específicos incluem:

- a) Avaliação da atividade enzimática de várias preparações de pectinases em diferentes condições de pressão e temperatura.
- b) Imobilização das pectinases em micropartículas com avaliação dos diferentes parâmetros cinéticos, com particular destaque para o estudo do efeito da pressão e da temperatura, da concentração de enzima e do substrato. Importantes parâmetros a avaliar serão a atividade e estabilidade operacional, e o tempo de armazenagem na eficiência enzimática.
- c) Avaliação da ação das pectinases em sumos, nomeadamente de laranja sob diferentes condições de pressão e temperatura.

Capítulo 3

Materiais e Métodos

3.1 Métodos experimentais

3.1.1 Imobilização da enzima

Reagentes:

Para todos os ensaios (à exceção dos ensaios efetuados com sumo), foi utilizada uma solução tampão de acetato de sódio 0,02M, pH 4,0 com pH semelhante ao sumo. Para a preparação da solução tampão, pesou-se 1,3675 g de acetato de sódio trihidratado ($C_2H_3NaO_2 \cdot 3 H_2O$) - MERCK, na balança (METTLER AE200), e dissolveu-se em 900 mL de água destilada. De seguida, fez-se o acerto do pH com ácido acético 100% glacial ($C_2H_4O_2$) - MERCK até 4,0. Por fim perfez-se o volume para 1000 mL.

O quitosano a 2% (m/v) foi preparado através da dissolução de 0,2 g de quitosano, de peso molecular médio – SIGMA-ALDRICH numa solução aquosa de ácido acético a 2% (v/v), num balão volumétrico, perfazendo os 10 mL. A solução aquosa de ácido acético a 2% (v/v), foi preparada através da diluição de 2 mL de ácido acético 100% glacial – MERCK em água destilada, num balão volumétrico de 100 mL, perfazendo o volume indicado.

Para a preparação da solução de hidróxido de sódio (NaOH) - MERCK 1N, dissolveu-se 4,0 g de NaOH em etanol (C_2H_6O) - MERCK a 26% (v/v), num balão volumétrico de 100 mL, perfazendo o volume indicado. A solução de etanol a 26% (v/v) foi obtida a partir da diluição de 26 mL de etanol (99,9% de pureza) em água destilada, perfazendo o volume de 100 mL.

Para a consolidação da matriz das microesferas foram usadas duas soluções (Furtado *et al.*, 2012):

- Glutaraldeído a 1% (v/v) - Sendo que, a embalagem de glutaraldeído ($C_5H_8O_2$) - MERCK apresentava uma ordem de pureza de 25%, pipetou-se 400 μ L deste composto para um balão volumétrico de 10 mL e diluiu-se com água destilada até perfazer os 10 mL.

- Glutaraldeído a 2% (v/v) e Sulfato de sódio a 13,5% (m/v) - Sendo que, a embalagem de glutaraldeído apresentava uma ordem de pureza de 25%, pipetou-se 800 μ L deste composto para um balão volumétrico de 10 mL e diluiu-se com água destilada até perfazer os 10 mL.
Para preparar a solução de sulfato de sódio (Na_2SO_4) - MERCK, dissolveu-se 1,35 g do mesmo com solução tampão acetato de sódio 0,02M, pH 4,0, num balão volumétrico de 10 mL, até perfazer o volume indicado. As duas soluções foram usadas numa proporção de 1:1.

Técnica:

A metodologia de imobilização da pectinase em microesferas de quitosano foi adaptada das técnicas descritas por Chiu *et al.* (2004) e Biró *et al.* (2008). A técnica selecionada para a imobilização das enzimas foi a inclusão.

As microesferas foram preparadas pelo método de precipitação, usando o quitosano a 2% como suporte.

Adicionou-se à solução de quitosano a 2% a quantidade de enzima correspondente à concentração enzimática pretendida no volume do meio reacional e, procedeu-se à sua homogeneização.

As enzimas (pectinases) selecionadas para este estudo foram obtidas de fungos do género *Aspergillus*, mais concretamente, *Aspergillus aculeatus* e *Aspergillus niger* – SIGMA-ALDRICH

A solução foi adicionada por gotejamento, através de uma seringa (Terumo) com uma agulha de 0,6 mm (Terumo Neolus), a uma solução de hidróxido de sódio 1N em etanol a 26% (v/v), contida num gobelé. Deve ser utilizada uma razão de massa de microesferas por volume de solução de precipitação de 1:10. Mantiveram-se as microesferas na solução de precipitação por um período de 4h, dentro de um banho de gelo, e sujeitas a agitação suave num agitador magnético (Velp). As microesferas obtidas foram lavadas com água destilada e filtradas com auxílio de um funil de büchner, utilizando uma razão de 1:10 de massa de imobilização para volume de água destilada para lavagem.

A reticulação (*cross-linking*) foi feita através da agitação das microesferas *overnight* a 150 rpm, a 25 °C, no agitador orbital (Agitorb 160 da Aralab). Utilizaram-se 2 processos distintos de consolidação de matriz:

- I. Glutaraldeído a 1% (v/v)
- II. Glutaraldeído a 2% (v/v) e sulfato de sódio a 13,5% (m/v), em tampão acetato de sódio, 0,02M, pH 4,00.

O sulfato de sódio e o glutaraldeído são agentes de reticulação físico e químico, respetivamente (Takei *et al.*, 2011).

Por fim, as microesferas foram lavadas com tampão acetato de sódio 0,02M, pH4,00.

Para uma melhor consolidação, é aconselhável deixar as microesferas repousarem um dia a -4 °C.

3.1.2 Ensaaios à pressão atmosférica

3.1.2.1 Ensaio com solução de substrato

Para se procederem às análises de modo a tirar resultados conclusivos, é necessário fazer um ensaio prévio simulando as condições ao qual o sumo será submetido, aquando da adição das enzimas pectolíticas, e usando uma solução padronizada que se assemelhe ao sumo. Para isso foi usado uma solução tampão de acetato de sódio a 0,02 M, pH 4,0, na qual se dissolveu pectina de frutos cítricos (SIGMA-ALDRICH), dando origem a uma solução de substrato.

Colocou-se a solução de substrato num tubo (BD Falcon™) e adicionou-se 1 mL de solução enzimática ou de 0,9960g de microesferas de enzima (o correspondente a 1 mL de solução enzimática). Os tubos foram colocados no banho termoestabilizado (Julabo SW 21) a 45 °C, com uma agitação de 80 rpm, durante um período de tempo previamente definido (30 minutos a 24 horas), retirando-se amostras nos tempos pretendidos, incluindo no tempo zero (logo após a adição da solução enzimática e

enzima imobilizada). Assim que retiradas as amostras, estas foram colocadas num banho de gelo de modo a cessar a reação enzimática.

Ao longo dos ensaios, deparou-se com constantes oscilações resultantes da fraca homogeneização.

Para melhorar a homogeneização da amostra, substituiu-se o tubo (BD Falcon™) por um frasco de maior diâmetro e de fundo plano e, aumentou-se a agitação para 150 rpm.

3.1.2.2 Ensaio com sumo de laranja

Preparação do sumo de laranja

Para a obtenção do sumo, as laranjas foram espremidas manualmente com auxílio de um espremedor, e de seguida foi filtrado num funil de büchner. O sumo filtrado foi conservado a - 4 °C, devidamente acondicionado para não sofrer oxidação.

Realização do ensaio

O protocolo foi semelhante ao descrito no item 3.1.2.1, à exceção da agitação, que foi nula.

3.1.3 Ensaios a alta pressão

Os ensaios a alta pressão foram realizados num vaso de aço inoxidável imerso num banho de água termoestabilizada, de acordo com a Figura 14. O fluido de pressurização era óleo hidráulico (Enerpac HF 95 Y) e a pressão requerida foi obtida com uma bomba manual de 400 MPa (Enerpac, modelo P228) e controlada utilizando uma pressão manométrica (Budenberg Medidor Co. Limited).

Para os ensaios a alta pressão, foram utilizadas frascos de plástico próprios para serem sujeito a pressões elevadas, com um volume de 9 cm³.

Colocaram-se, simultaneamente seis células, no interior do vaso de alta pressão, parcialmente cheio com óleo hidráulico e, o recipiente foi selado com uma tampa de aço por aparafusamento.

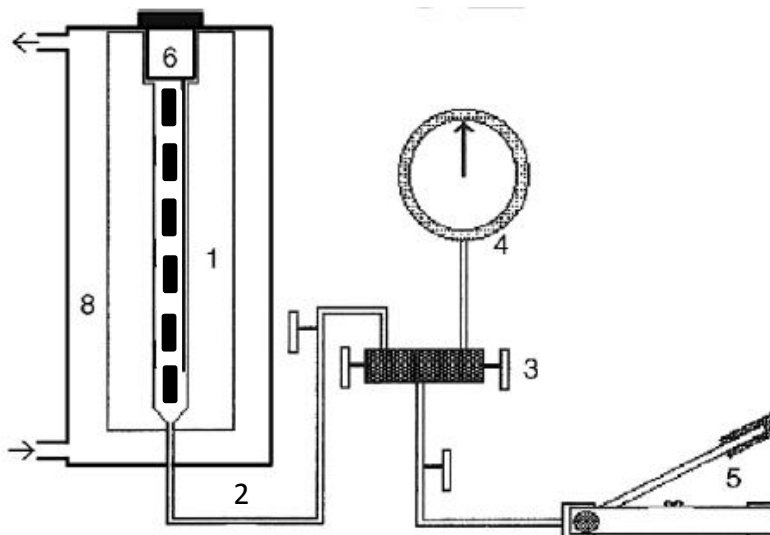


Figura 14 – Aparelho de alta pressão. (1) vaso de alta pressão, (2) tubo de aço, (3) válvula, (4) medidor de pressão, (5) bomba manual, (6) tampa do vaso, (7) célula de reação, (8) banho termoeletrizado (Vila-Real *et al.*, 2007).



Figura 15 – Aparelho de alta pressão utilizado nos ensaios.

3.1.3.1 Ensaio com solução de substrato

Para testar a atividade das pectinases a alta pressão, foi necessário fazer alguns ensaios (com a solução de substrato) de modo a determinar qual a melhor combinação de pressão e temperatura, bem como determinar o tempo necessário para obter os melhores resultados.

Para o ensaio colocou-se 7 mL de solução de substrato e adicionou-se 1,63 g de microesferas (o correspondente a 1,4 mL de solução enzimática), mantendo-se uma relação com as quantidades usadas nos ensaios anteriores (5 mL de solução de substrato e 1 mL de solução enzimática).

A solução de substrato juntamente, com a enzima imobilizada, foram colocadas num frasco específico para pressões elevadas, sendo que este deve estar totalmente cheio, sem qualquer presença de ar no seu interior, e o mesmo deve apresentar-se devidamente selado com parafilme.

Os frascos são colocados no vaso de alta pressão quando este já se encontra à temperatura definida. O vaso foi devidamente fechado e procedeu-se ao aumento de pressão. Foram testadas pressões entre os 50 e os 200 MPa e temperaturas entre os 55 e os 85 °C.

O ensaio a alta pressão foi efetuado de igual forma ao da pressão atmosférica, à exceção da agitação, que é nula, e das amostragens. Cada amostra corresponde a um ensaio a alta pressão. Os ensaios tiveram uma duração entre 30 a 120 minutos.

3.1.3.2 Ensaio com sumo de laranja

Efetuaram-se ensaios com o intuito de testar diferentes pressões e temperaturas, de modo a definir a temperatura ótima num ensaio de alta pressão e, a possibilidade de aliar a pasteurização com a alta pressão.

Preparação do sumo de laranja

Para a obtenção do sumo, as laranjas foram espremidas manualmente com auxílio de um espremedor, e de seguida foi filtrado num funil de büchner. O sumo filtrado foi conservado a - 4 °C, devidamente acondicionado para não sofrer oxidação.

Realização do ensaio

Colocou-se 7 mL de solução de substrato e adicionou-se 1,63 g de microesferas (o correspondente a 1,4 mL de solução enzimática), mantendo-se uma relação com as quantidades usadas nos ensaios anteriores (5 mL de solução de substrato e 1 mL de solução enzimática).

O sumo juntamente com a enzima imobilizada foram colocados num frasco específico para pressões elevadas, sendo que este deve estar totalmente cheio, sem qualquer presença de ar no seu interior, e o mesmo deve-se apresentar devidamente selado com parafilme.

Os frascos foram colocados no vaso de alta pressão quando este já se encontrava à temperatura definida. O vaso foi devidamente fechado e procedeu-se ao aumento de pressão.

O ensaio a alta pressão foi efetuado de igual forma ao da pressão atmosférica, à exceção da agitação, que é nula, e das amostragens. Cada amostra corresponde a um ensaio a alta pressão. Os ensaios tiveram uma duração entre 30 a 120 minutos.

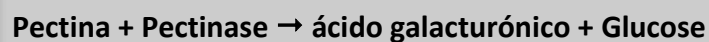
3.2 Métodos analíticos

3.2.1 Método do Ácido Dinitrosalicílico (DNS)

Fundamento Teórico:

O método DNS, definido por Miller (1959), permite identificar a presença de grupos carbonilo livre (C=O), também designados por açúcares redutores. Este método envolve a oxidação do grupo funcional aldeído presente na glucose. Simultaneamente, o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) é reduzido a ácido 3-amino-5 nitrosalicílico sob condições alcalinas (Abbès *et al.*, 2011).

A degradação da pectina pelas enzimas pectolíticas, liberta unidades de ácido galacturónico e de açúcares (Abbès *et al.*, 2011). Uma unidade de atividade de enzima é definida como a enzima que liberta 1 $\mu\text{mol/ml/min}$ de ácido galacturónico sob condições padronizadas de ensaio (Jayani *et al.*, 2005).



A utilização de reagente de DNS para a determinação dos açúcares redutores não é apenas um método amplamente praticado, mas é, também, um ensaio recomendado pela *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) (Saqib *et al.*, 2011).

Reagentes:

Para a preparação do reagente DNS, adiciona-se 50 mL de NaOH 2N a 2,5 g de ácido dinitrosalicílico e aproximadamente 125 mL de água destilada e agita-se até à dissolução. Posteriormente, adiciona-se 75g de sal de Rochelle e completa-se o volume da solução para 250 mL. Este reagente é instável na presença de luz e CO_2 .

Procedimento:

O ensaio foi feito em duplicado, tanto para as amostras como para as soluções padrão, sendo que, para estas últimas, o ensaio foi realizado para identificação de possíveis erros ou problemas existentes durante o mesmo.

Nos poços da microplaca colocaram-se 75 μL de amostra ou solução padrão e 75 μL de reagente de DNS (tonalidade amarela). Colocou-se a microplaca, devidamente acondicionada, no banho a 100 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos (a solução dos poços adquire uma tonalidade avermelhada). De seguida, deixou-se repousar até arrefecer à temperatura ambiente, e procedeu-se à medição das absorvâncias das amostras, no biofotómetro (Eppendorf Biophotometer), a 562 nm. O valor de absorvância obtido foi relacionado com a concentração de glucose através da construção de uma reta de calibração, dando a relação exata entre A562 e concentração de glucose.

O estabelecimento da reta de calibração (Figura 16) foi efetuado com dez soluções padrão de D-glucose anidra - MERCK de diferentes concentrações (0,25 e 2,00 mM).

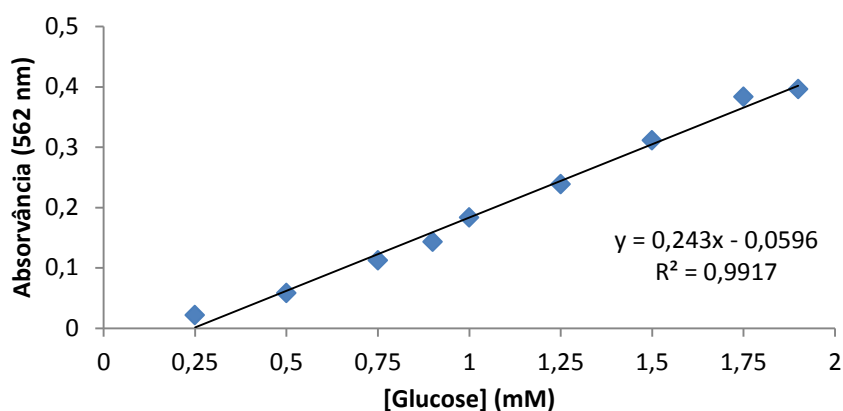


Figura 16 – Reta de calibração da glucose.

Com um coeficiente de determinação de 0,9917, a equação da reta, $y = 0,243x - 0,0596$, será usada para converter as absorvâncias obtidas nas leituras do biofotómetro, na realização do método DNS.

3.2.2 Método de Bradford

Fundamento teórico:

O método de Bradford baseia-se na ligação do corante “Coomassie brilliant blue” BG-250 com a proteína (Bradford, 1976). Este é um método rápido e preciso para a estimativa da concentração de proteína, essencial em muitos campos de estudo de proteínas, tornando-se o método preferido para a quantificação de proteína em muitos laboratórios. Esta técnica é mais simples, mais rápida e mais sensível que o método de Lowry. Além disso, quando comparado com o método de Lowry, é sujeito a uma menor interferência por reagentes comuns e componentes não proteicos de amostras biológicas (Kruger, 1994).

Estes interferentes normalmente reagem com as proteínas impedindo a reação com o corante BG-250 ou reagem com o corante causando aumento na absorvância.

No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniónica, que absorve fortemente em 595 nm (Kruger, 1994).

Reagentes:

O reagente de Bradford (BIO-RAD) é composto pelo corante Coomassie Brilliant Blue BG-250, etanol, ácido fosfórico e água destilada. Este reagente deve ser mantido num ambiente refrigerado.

Procedimento:

Colocar 100 µL de amostra (ou solução padrão) em cada poço da microplaca e adicionar 25 µL de reagente Bradford. Agitar a solução dos poços e deixar repousar 5 minutos. A absorvância das amostras é lida em triplicado a 595nm, numa célula de plástico, num biofotómetro (Eppendorf Biophotometer) entre 5 a 10 minutos.

A reta de calibração do método Bradford foi efetuada com 6 soluções padrão de pectinase de diferentes concentrações:

- *Aspergillus aculeatus* (3,800 U/mL): 1 µL de enzima/mL – 1 mg/mL (0 mg/mL e 1 mg/mL.)
- *Aspergillus niger* (1,320 U/mg): 300 µg de enzima/mL – 0,3 mg/mL (0 mg/mL e 0,3 mg/mL).

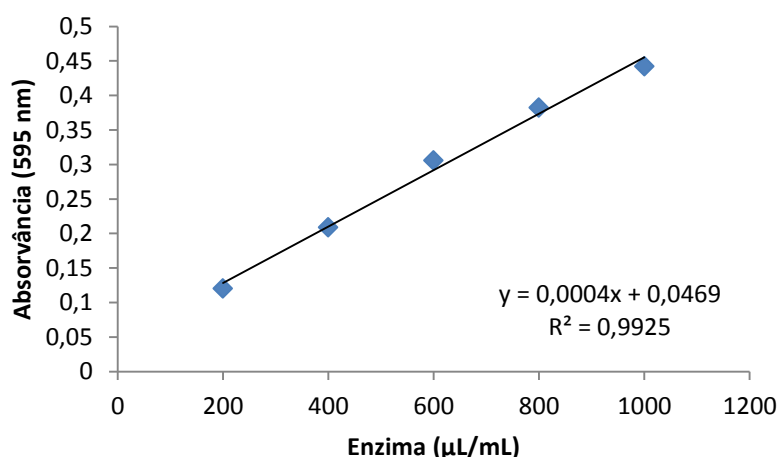


Figura 17 – Reta de calibração da proteína da *Aspergillus aculeatus*.

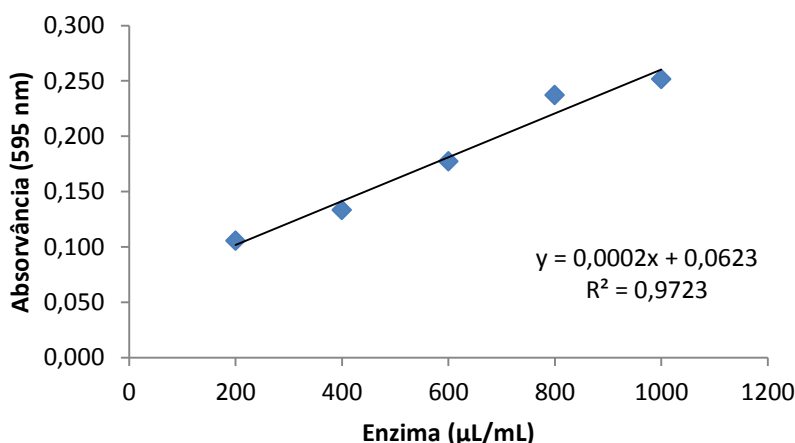


Figura 18 – Reta de calibração da proteína da *Aspergillus niger*.

3.2.3 Análise dos carotenoides

Procedimento:

A absorvância das amostras foi determinada a um comprimento de onda de 450 nm contra um branco de água destilada, utilizando um espectrofotómetro Hitachi U-2000. Para esta determinação, utilizou-se apenas a parte sobrenadante do sumo (parte translúcida após decantação das partículas sólidas). Para uma melhor comparação, mediu-se também a absorvância das amostras após homogeneização da mesma, por forma a conhecer o valor inicial de turbidez.

As absorvâncias foram traduzidas em percentagem, considerando a média de absorvâncias do sumo, ao qual não foram adicionadas enzimas nem foi submetido ao processamento a alta pressão, o valor de 100%.

3.2.4 Determinação dos açúcares - °Brix

Procedimento:

Homogeneizar a amostra, colocar uma gota de amostra no vidro (azul) do refratómetro portátil (Instrutherm) e colocar a tampa de plástico em cima da gota. Apontar o refratómetro para uma fonte luminosa, de forma a conseguir visualizar uma linha, e registar a %Brix correspondente. Essa percentagem corresponde à concentração de açúcares presente na amostra.

3.2.5 Determinação do pH

Procedimento:

A determinação do pH foi efetuada num potenciómetro (Metrohm 744).

Antes de fazer a leitura das amostras, é necessário calibrar o potenciómetro, usando soluções padronizadas com pHs compreendidos entre 4,00 e 7,00. De seguida, são lidas as amostras.

3.2.6 Determinação do ácido ascórbico (Vitamina C)

Reagentes:

Os reagentes a utilizar neste método analítico, o ácido metafosfórico a 3% e a solução de 2,6-diclorofenolindofenol, foram preparados previamente.

Para a preparação do ácido metafosfórico a 3%, dissolveram-se 16,30 g de ácido metafosfórico (HPO_3) - MERCK em 43,40 mL de ácido acético 100% glacial e 500 mL de água destilada.

A preparação da solução de 2,6-diclorofenolindofenol fez-se por dissolução de 105 mg de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) - MERCK em 375 mL de água destilada, dando origem a uma solução aquosa de bicarbonato de sódio à qual foram adicionadas 130 mg de 2,6-diclorofenolindofenol ($\text{C}_{12}\text{H}_7\text{NCl}_2\text{O}_2$) - MERCK num volume de 500 mL de água destilada.

Paralelamente foi preparada uma solução padrão de ácido ascórbico por dissolução de 10 mg de ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) - MERCK em 50 mL de ácido metafosfórico a 3% (solução I).

Aferição e Padronização da solução de 2,6-diclorofenolindofenol:

Dissolveram-se 2 mg de ácido ascórbico em 10 mL de ácido metafosfórico a 3%. Esta solução foi imediatamente utilizada para a padronização da solução de 2,6-diclorofenolindofenol devido à sua instabilidade.

Diluíram-se 5 mL de solução de ácido ascórbico (este volume contém 1 mg de ácido ascórbico) em 5 mL de ácido metafosfórico a 3%. Titulou-se com a solução de corante até obtenção de cor rósea estável durante 15 minutos.

Técnica:

De modo a aferir a solução de 2,6-diclorofenolindofenol com uma solução padrão de ácido ascórbico efetuou-se o seguinte procedimento:

- Transferiu-se 0,4 mL de solução padrão de ácido ascórbico (solução I) para um balão de 10 mL e completar o volume com solução de ácido metafosfórico a 3%.
- Transferiu-se a solução preparada para um *erlenmeyer* de 25 mL e titulou-se com solução de 2,6-diclorofenolindofenol até ao aparecimento de uma coloração rósea estável pelo menos 5 segundos.
- Realizou-se um ensaio em branco, titulando, para isso, 10 mL de solução de ácido metafosfórico a 3%.

Este procedimento foi realizado em triplicado e expressou-se a concentração da solução padrão de 2,6-diclorofenolindofenol em termos de mg equivalentes de ácido ascórbico.

O doseamento de ácido ascórbico na amostra foi realizado da seguinte forma:

- Centrifugou-se parte da amostra (parte translúcida) numa microcentrífuga (Heraeus – Biofuge Pico).
- Transferiu-se 1 mL de amostra para um balão de 10 mL e completou-se o volume com solução de ácido metafosfórico a 3%.
- Titulou-se esta solução com solução de 2,6-diclorofenolindofenol até ao aparecimento de uma coloração rósea estável pelo menos por 5 segundos.
- Realizou-se um ensaio em branco titulando, para isso, 10 mL de solução de ácido metafosfórico a 3%.

A determinação analítica do teor de ácido ascórbico foi baseada na titulação da amostra com uma solução corante padronizada de 2,6-diclorofenolindofenol.

Cálculos:

Para a determinação do teor de ácido ascórbico por titulação, torna-se necessário realizar alguns cálculos.

Concentração da solução padrão de ácido ascórbico (Solução I – 0,2 mg/mL)	Diferença entre os mL de titulante gasto com a solução padrão e os mL de titulante gasto com o ensaio em branco
Concentração da amostra – x	Diferença entre os mL de titulante gasto com a amostra e os mL de titulante gasto com o ensaio em branco

Capítulo 4

Resultados e Discussão

4.1 Estudo da atividade das pectinases à pressão atmosférica

Durante o estudo da atividade das pectinases, foram testados vários fatores de modo a encontrar as condições ótimas de ensaio, nomeadamente a concentração de enzima e de substrato, e a temperatura.

4.1.1 Pectinase de *Aspergillus aculeatus* em solução

4.1.1.1 Estudo do efeito da variação de concentração de enzima

Para a pectinase de *Aspergillus aculeatus*, foram testadas três concentrações de enzima: 100, 200 e 400 $\mu\text{L/mL}$ (concentração no meio reacional: 16,67; 33,33 e 66,67 $\mu\text{L/mL}$, respetivamente) numa solução de substrato com uma concentração de 400 $\mu\text{g/mL}$ (333,33 $\mu\text{L/mL}$ no meio reacional).

Foi feito um estudo inicial para controlo da degradação de pectina ao longo do tempo, no meio reacional sem enzima (a 45 °C e à pressão atmosférica). Neste estudo não se verificou alteração da mesma.

Devido à oscilação constante dos valores obtidos nos ensaios anteriores, decidiu-se então, para os ensaios seguintes, que as amostragens seriam feitas de 5 em 5 minutos até aos 60 minutos e, a partir daí, de 30 em 30 minutos até aos 180 minutos, para uma melhor compreensão da reação nos tempos intermédios. A amostragem das 24 horas não está inserida no gráfico.

Os resultados obtidos apresentam-se na Figura 19.

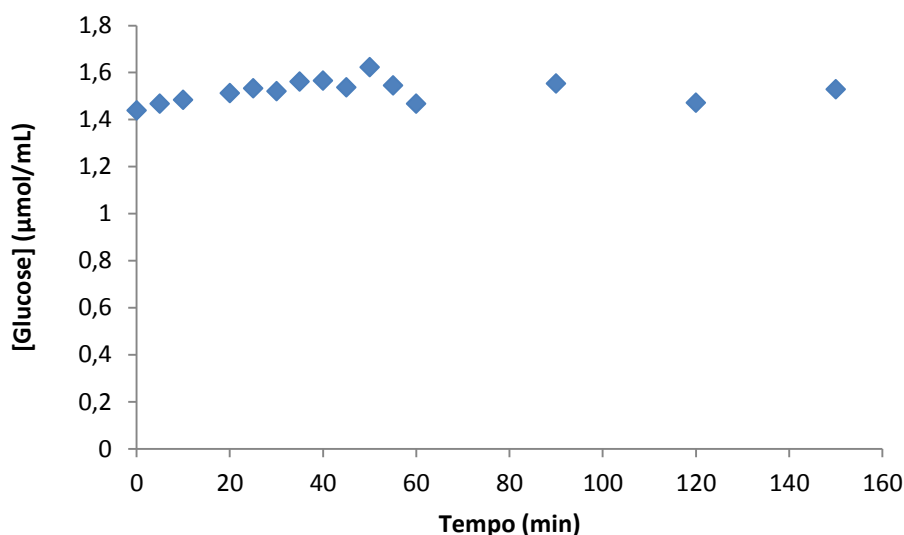


Figura 19 – Ensaio com pectinase de *Aspergillus aculeatus* numa concentração de 100 µL/mL, a pH 4,0, em solução tampão de acetato de sódio 0,02 M, à temperatura de 45 °C e com uma concentração de pectina de 400 µg/mL.

Segundo se observa no gráfico apresentado na Figura 19, a velocidade inicial da reação é muito elevada, pois, logo na primeira amostragem (0 minutos) o valor obtido é já de 1,440 µmol/mL e, este valor, diferencia-se pouco do valor da última amostragem (1,530 µmol/mL), ou seja, quase toda a pectina é degradada aos 0 minutos, apresentando, assim, uma atividade muito elevada. Nas amostragens seguintes, nota-se um ligeiro aumento da concentração de glucose, atingindo a maior concentração (1,623 µmol/mL) aos 50 minutos.

Nos ensaios seguintes, alterou-se não só a concentração de enzima (200 e 400 µL/mL) mas, também, os tempos de amostragens. As amostragens foram realizadas de 3 em 3 minutos até aos 30 minutos, de seguida de 5 em 5 minutos até aos 60 minutos e, por fim, de 30 em 30 minutos até aos 180 minutos.

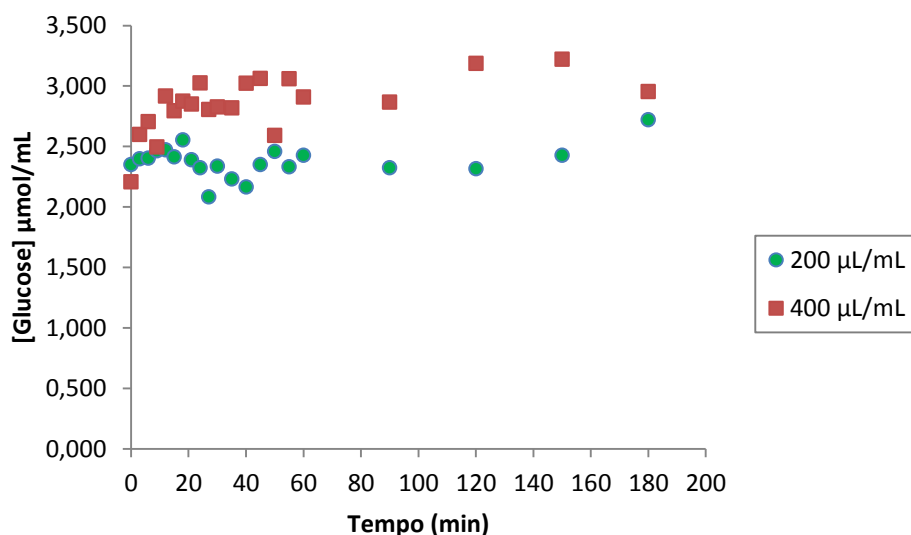


Figura 20 – Ensaio com pectinase de *Aspergillus aculeatus* nas concentrações de 200 µL/mL e 400 µL/mL, a pH 4,0, em solução tampão de acetato de sódio 0,02 M, à temperatura de 45 °C e com uma concentração de pectina de 400 µg/mL.

Nas Figura 20, pode-se verificar, novamente, que a velocidade inicial da reação é muito elevada pois, logo na primeira amostragem (0 minutos) a concentração de glucose é de 2,350 (200 µL/mL) e 2,207 µmol/mL (400 µL/mL).

A atividade desta enzima é muito elevada pois quase toda a pectina foi degradada logo após a adição da solução enzimática à solução de substrato, havendo uma ligeira diferença entre o valor obtido na amostragem dos 180 minutos e a primeira amostragem (0,371 µmol/mL) no ensaio com uma concentração de enzima de 200 µL/mL. Já no ensaio realizado com uma concentração de enzima de 400 µL/mL a diferença foi maior, obtendo-se a diferença de 0,747 µmol/mL.

O valor da amostra referente às 24 horas, no ensaio de 200 µL/mL, apresentou um valor abaixo (2,509 µmol/mL) do valor obtido na amostra dos 180 minutos (2,721 µmol/mL). Isto deve-se, provavelmente, ao facto da amostra não ter sido analisada ao mesmo tempo, havendo outros fatores que o justifiquem, como a temperatura no banho não estar exatamente à mesma temperatura, quando se colocou a microplaca no mesmo.

Comparando os três ensaios, no ensaio de 400 µL/mL observou-se uma maior degradação de pectina mas, na amostra das 24 horas, apresentou um valor (3,329 µmol/mL) ligeiramente superior ao obtido logo aos 150 minutos (3,223 µmol/mL).

Todos os ensaios tiveram uma duração total de 24 horas, contudo pode-se constatar que, não houve grande diferença de valores entre a última amostragem (24h) e as anteriores.

No geral, pode-se constatar que, um aumento da concentração de enzima gera um aumento da velocidade de reação e assim um aumento da velocidade de degradação de pectina. Claro que, se a concentração de enzima for muito elevada, a reação dá-se muito depressa, degradando-se toda a pectina muito mais rapidamente. Contudo, o uso de enzima em excesso poderá tornar o processo dispendioso.

4.1.1.2 Estudo do efeito da variação de concentração de substrato

Para a pectinase de *Aspergillus aculeatus*, foram testadas três concentrações de substrato: 100, 200 e 400 $\mu\text{g/mL}$ (concentração no meio reacional: 83,3; 166,7 e 333,3 $\mu\text{g/mL}$, respetivamente), com uma solução enzimática na concentração de 200 $\mu\text{L/mL}$ (concentração no meio reacional de 33,33 $\mu\text{L/mL}$).

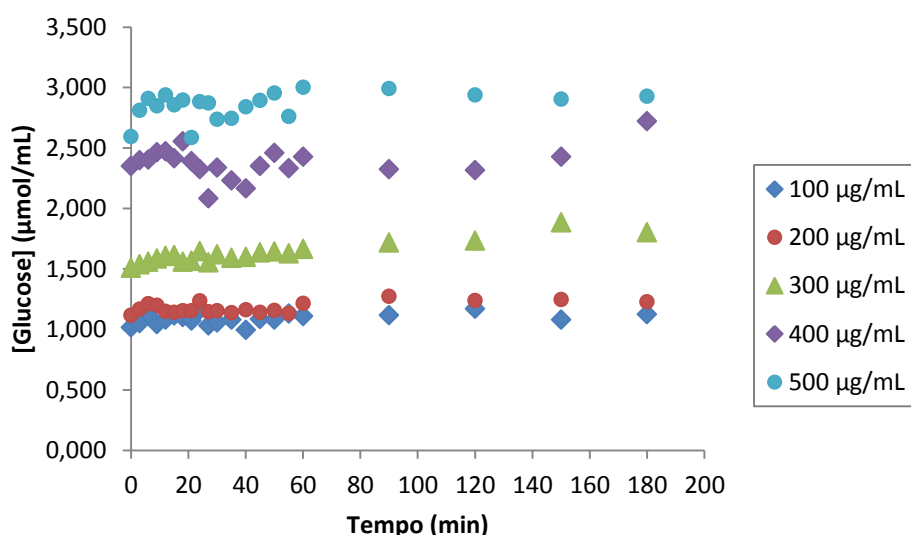


Figura 21 – Ensaio com pectinase de *Aspergillus aculeatus* (200 $\mu\text{g/mL}$) em soluções com diferentes concentrações de substrato, a pH 4,0, à temperatura de 45 °C.

Na Figura 21, observa-se uma grande semelhança entre os ensaios de 100 e 200 µg/mL. Estes apresentam uma diferença mínima entre a primeira amostragem e a amostragem dos 180 minutos, ao contrário dos restantes ensaios.

No geral, verifica-se que, mantendo a concentração de pectinase, ao aumentar a concentração de substrato há também um aumento de degradação da pectina.

Todos os ensaios tiveram uma duração total de 24 horas, contudo pode-se constatar, com auxílio da Tabela 4, que não houve grande diferença de valores entre a última amostragem (24h) e as anteriores.

Tabela 4 – Amostragens dos 180 minutos e das 24 horas dos ensaios com pectinase de *Aspergillus aculeatus* em soluções de substrato com concentrações de 100, 200, 300, 400 e 500 µg/mL.

Tempo (min)	[Glucose] (µmol/mL)				
	100 µg/mL	200 µg/mL	300 µg/mL	400 µg/mL	500 µg/mL
180	1,126	1,228	1,803	2,721	2,929
1440	1,317	1,526	1,954	2,509	3,146

4.1.1.3 Estudo do efeito da variação da temperatura

A atividade da pectinase de *Aspergillus aculeatus*, foi testada às temperaturas de 50, 60, 70, 80 e 90 °C, usando uma concentração de substrato de 400 µg/mL (concentração no meio reacional: 333,3 µg/mL) e uma concentração de enzima de 200 µL/mL (concentração no meio reacional: 33,33 µL/mL).

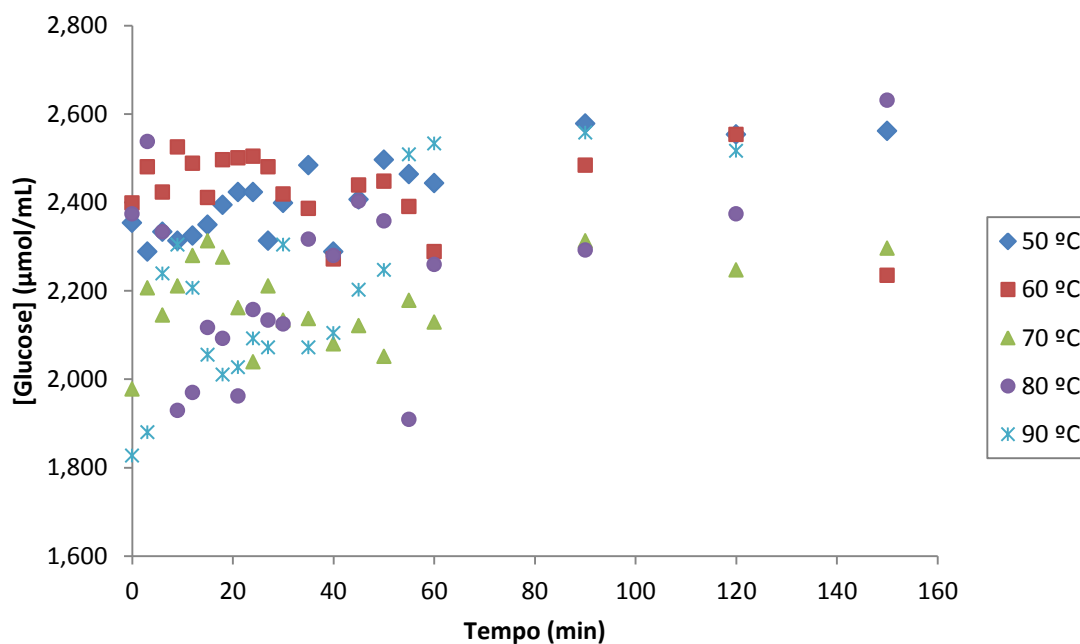


Figura 22 – Ensaio com pectinase de *Aspergillus aculeatus* (200 µg/mL) realizados às temperaturas de 50, 60, 70, 80 e 90 °C, a pH 4,0, em solução tampão de acetato de sódio 0,02 M, com uma concentração de pectina de 400 µg/mL

Na Figura 22, apresentam-se os resultados até aos 150 minutos pois, nos ensaios a 80 e 90 °C, houve evaporação de amostra, impossibilitando de recolher as mesmas aos 180 minutos.

Verifica-se que os melhores resultados são obtidos a 60 °C, havendo um decréscimo de atividade dos 70 aos 90 °C, contudo, a enzima continua a ter atividade até aos 90 °C.

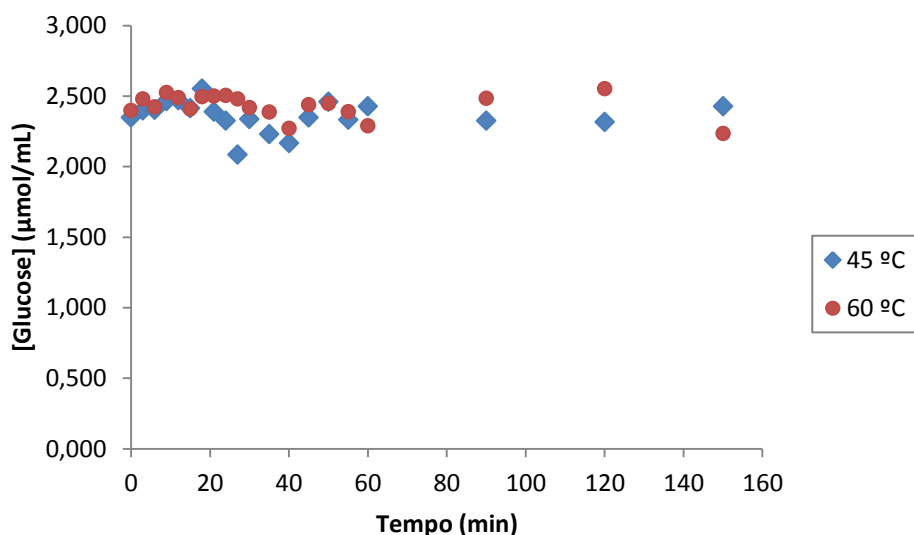


Figura 23 – Ensaio com pectinase de *Aspergillus aculeatus* (200 µg/mL) realizados às temperaturas de 45 e 60 °C, a pH 4,0, em solução tampão de acetato de sódio 0,02 M, com uma concentração de pectina de 400 µg/mL.

Comparando com os ensaios feitos anteriormente, usando as mesmas concentrações de enzima e substrato, realizado a 45 °C, verifica-se uma grande semelhança de resultados, ainda assim, o ensaio a 60 °C obteve melhores resultados.

4.1.2 Pectinase de *Aspergillus aculeatus* imobilizada

No estudo da pectinase de *Aspergillus aculeatus* imobilizada em quitosano a 2%, foram efetuados os ensaios do estudo da atividade e da estabilidade simultaneamente.

Para estes ensaios usou-se uma concentração de enzima de 100 µL/mL (concentração no meio reacional – 16,67 µL/mL) e uma concentração e substrato de 400 µg/mL (concentração no meio reacional – 333,3 µg/mL).

Testaram-se duas soluções de consolidação do quitosano: glutaraldeído a 1% e glutaraldeído a 2% com sulfato de sódio a 13,5% em solução tampão acetato de sódio 0,02M, pH 4,0. Os resultados dos ensaios são apresentados de seguida.

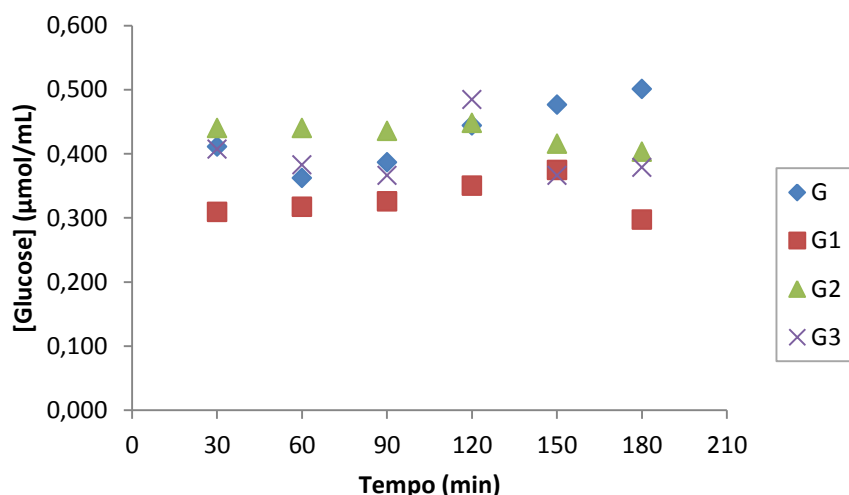


Figura 24 – Ensaio do estudo da atividade e estabilidade da pectinase de *Aspergillus aculeatus* imobilizada em quitosano (2%) usando glutaraldeído como solução de consolidação da matriz. (G) Glutaraldeído a 1%; (1,2,3) 1ª, 2ª, 3ª Reutilização.

No estudo da estabilidade da enzima, foram realizadas três reutilizações.

O primeiro ensaio de reutilização (G1) foi o que apresentou valores mais baixos. Apesar dos valores dos ensaios de reutilização seguintes (G2 e G3) não se diferenciarem muito do ensaio do primeiro ensaio (G), não apresentam, dentro dos mesmos, grande variação.

No ensaio em que se utilizou a mistura de glutaraldeído e sulfato de sódio como solução de consolidação da matriz, observa-se novamente uma diminuição da atividade da enzima, comparando com os valores obtidos no ensaio realizado com a pectinase em solução, nas mesmas concentrações de enzima e substrato. Contudo, mostra ainda uma elevada atividade (atingindo um máximo de 0,820 µmol/mL).

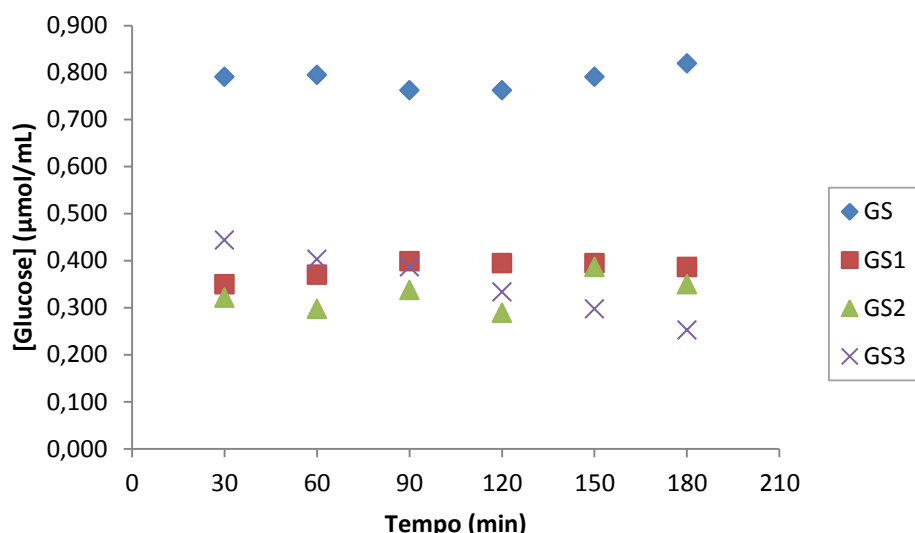


Figura 25 – Ensaio do estudo da atividade e estabilidade da pectinase de *Aspergillus aculeatus* imobilizada em quitosano (2%) usando uma mistura glutaraldeído e sulfato de sódio como solução de consolidação da matriz. (GS) Glutaraldeído a 2% com sulfato de sódio a 13,5% em solução tampão de acetato de sódio 0,02M, pH 4,0; (1,2,3) 1ª, 2ª, 3ª Reutilização.

No estudo da estabilidade da enzima, foram realizadas igualmente três reutilizações.

Do primeiro ensaio realizado (GS) para o primeiro ensaio de reutilização (GS1) observa-se uma diminuição acentuada, como se pode verificar logo na amostra dos 30 minutos, no primeiro ensaio apresenta uma concentração de 0,791 µmol/mL ao passo que no primeiro ensaio de reutilização apenas apresenta uma concentração de 0,350 µmol/mL. Do primeiro ensaio de reutilização para o segundo e, do segundo ensaio de reutilização para o terceiro há ainda uma diminuição da concentração contudo, esta já não é tão acentuada.

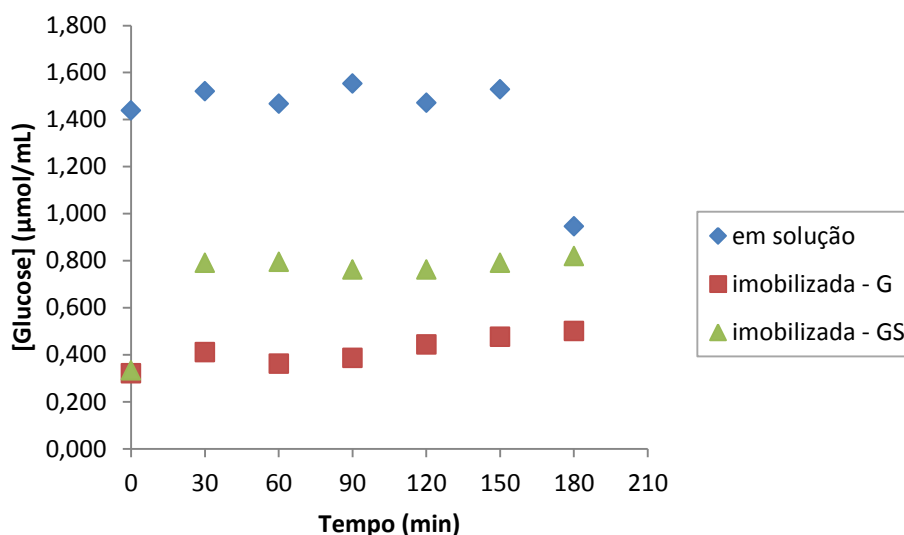


Figura 26 – Ensaio do estudo da atividade da pectinase de *Aspergillus aculeatus* em solução e imobilizada em quitosano (2%) com duas soluções de consolidação de matriz. (G) Glutaraldeído a 1%; (GS) Glutaraldeído a 2% com sulfato de sódio a 13,5% em solução tampão de acetato de sódio 0,02M, pH 4,0.

Observando a Figura 26, nas mesmas concentrações de enzima e substrato, verifica-se uma menor atividade da enzima quando imobilizada, comparativamente à enzima em solução.

Comparando os resultados obtidos com microesferas consolidadas apenas com glutaraldeído e os resultados obtidos com microesferas consolidadas com glutaraldeído e sulfato de sódio, os melhores resultados foram alcançados com a mistura de ambos.

Os resultados dos primeiros ensaios de reutilização (G1 e GS1) já se apresentam mais semelhantes contudo, o ensaio onde se utilizou a mistura de glutaraldeído a 2% e sulfato de sódio a 13,5% (GS1) continua a apresentar melhores resultados.

Os resultados do segundo ensaio de reutilização onde se utilizou apenas Glutaraldeído (1%) são melhores que os do ensaio da segunda reutilização com a mistura de glutaraldeído (2%) e sulfato de sódio (13,5%) sendo que neste último os valores são mais baixos e mais variáveis.

Por fim, o ensaio da terceira reutilização onde foi usada a mistura de glutaraldeído (2%) e sulfato de sódio (13,5%) (GS3) ensaio continua a apresentar valores mais baixos que G3 e, há uma diminuição gradual da concentração enquanto,

em G3, os valores se mantêm relativamente próximos, ainda assim com algumas variações.

Para compreender melhor estas variações, fez-se análises (método Bradford) para verificar se houve perda de enzima (proteína) durante os ensaios, medindo-se, então, o valor de proteína das amostras.

4.1.3 Pectinase de *Aspergillus niger* em solução

4.1.3.1 Estudo do efeito da variação de concentração de enzima

Para a pectinase de *Aspergillus niger*, foram testadas três concentrações de enzima: 100, 200 e 400 $\mu\text{g/mL}$ (concentração do meio reacional: 16,67; 33,33 e 66,67 $\mu\text{g/mL}$) numa solução de substrato com uma concentração de 400 $\mu\text{g/mL}$ (concentração do meio reacional de 333,33 $\mu\text{g/mL}$).

Para estes ensaios, as amostras foram colhidas apenas de 30 em 30 minutos até aos 180 minutos.

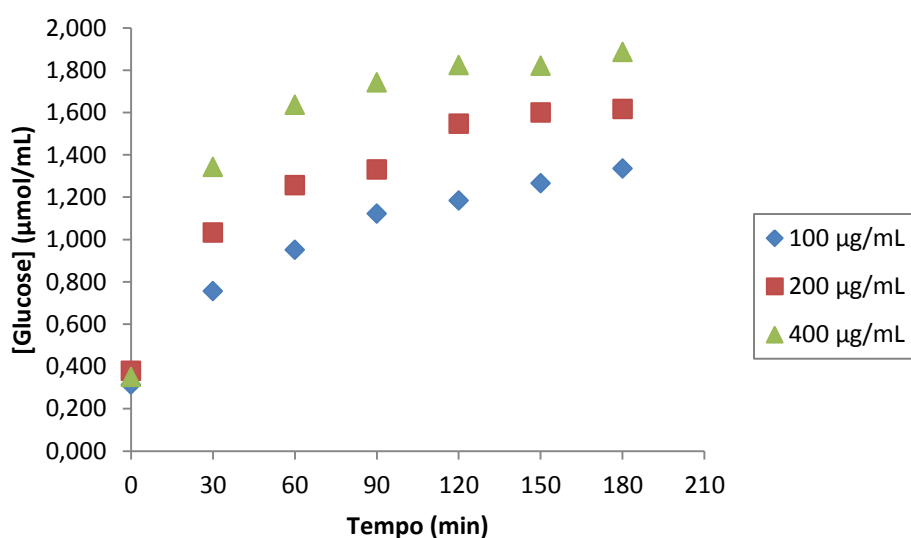


Figura 27 – Ensaio com pectinase de *Aspergillus niger* em diferentes concentrações a pH 4,0, à temperatura de 45 °C e com uma concentração de pectina de 400 $\mu\text{g/mL}$.

Comparando os diversos ensaios em que se usou pectinase de *Aspergillus niger*, observa-se que, tal como os ensaios com pectinase de *Aspergillus aculeatus*, o aumento da concentração de pectinase origina o aumento da velocidade de reação, logo uma maior quantidade de pectina é degradada e, mais rapidamente.

4.1.3.2 Estudo do efeito da variação de concentração de substrato

Para a pectinase de *Aspergillus niger*, foram testadas três concentrações de substrato: 100, 200 e 400 $\mu\text{g/mL}$ (concentração no meio reacional: 83,33; 166,67 e 333,33 $\mu\text{g/mL}$) com uma solução enzimática na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ (concentração no meio reacional de 16,67 $\mu\text{g/mL}$).

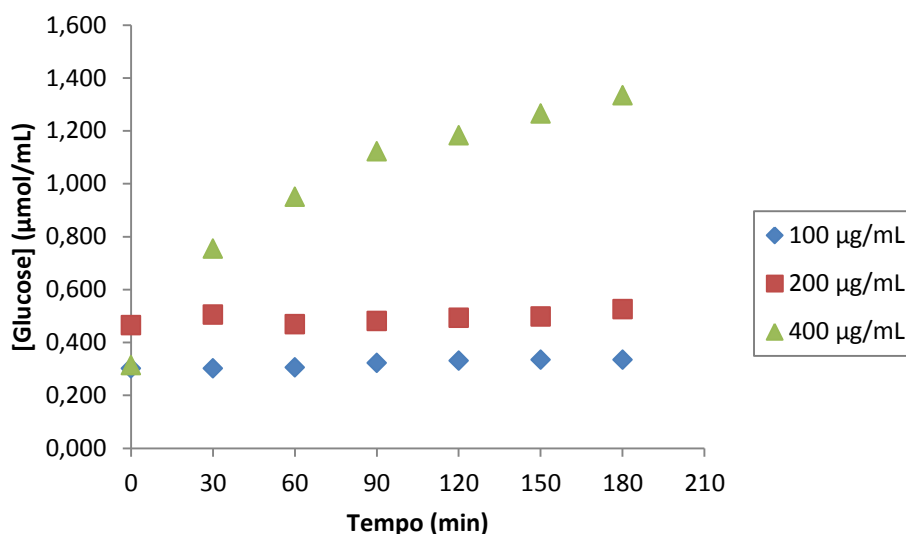


Figura 28 – Ensaio com pectinase de *Aspergillus niger* (100 $\mu\text{g/mL}$) em soluções com diferentes concentrações de substrato, a pH 4,0, à temperatura de 45 °C.

Verifica-se que, nos ensaios onde foram usadas as concentrações mais baixas (100 e 200 $\mu\text{g/mL}$) de pectina, existe pouca variação entre a primeira e a última amostragem. Já no ensaio onde é usada a maior concentração de pectina, verifica-se que, existe uma grande variação entre os valores da primeira e última amostragem.

Ainda que menos acentuada nos ensaios com menor concentração de pectina, no geral, verifica-se que, o aumento da concentração de substrato origina, naturalmente, um aumento da concentração de glucose, ou seja, uma maior degradação da pectina.

4.1.3.3 Estudo do efeito da variação da temperatura

A atividade da pectinase de *Aspergillus niger*, foi testada a uma temperatura de 80 °C, usando uma concentração de substrato de 400 µg/mL (concentração no meio reacional: 333,3 µg/mL) e uma concentração de enzima de 100 µg/mL (concentração no meio reacional: 16,67 µg/mL).

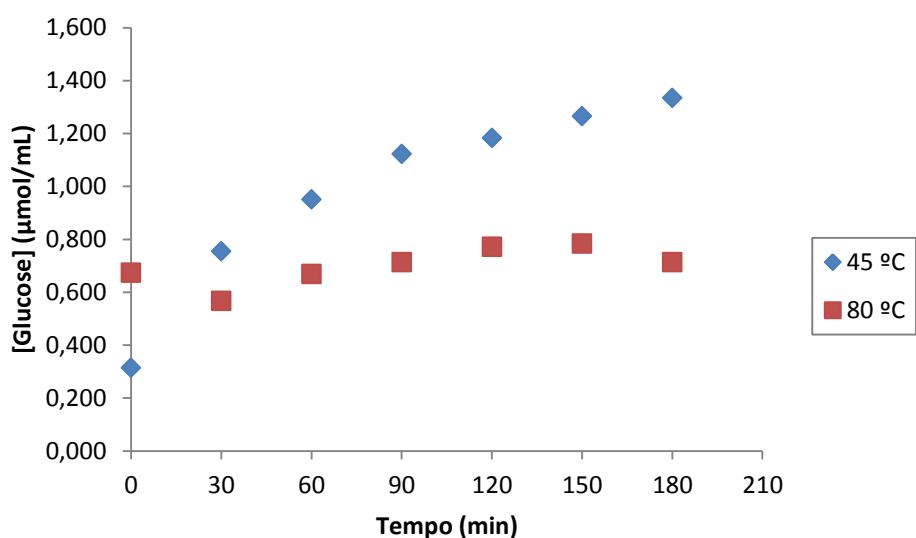


Figura 29 – Ensaio com pectinase de *Aspergillus niger* (100 µg/mL), realizado à temperatura de 45 e 80 °C, a pH 4,0, em solução tampão de acetato de sódio 0,02 M, com uma concentração de pectina de 400 µg/mL

Comparativamente aos ensaios de variação de enzima e substrato, em que foi usada uma concentração de enzima de 100 µg/mL e uma concentração de substrato de 400 µg/mL, realizados a uma temperatura de 45 °C, verificou-se uma diminuição da atividade da enzima no ensaio a 80 °C.

4.1.4 Pectinase de *Aspergillus niger* imobilizada

No estudo da pectinase de *Aspergillus niger* imobilizada em quitosano (2%), realizou-se, igualmente, os ensaios do estudo da atividade e da estabilidade.

Para estes ensaios usou-se uma concentração de enzima de 300 µg/mL (concentração no meio reacional – 50 µg/mL) e uma concentração de substrato de 400 µg/mL (concentração no meio reacional – 333,3 µg/mL).

Tendo-se verificado nos ensaios realizados com a pectinase de *Aspergillus aculeatus* imobilizada que, se obtiveram melhores resultados com a mistura de glutaraldeído a 2% com sulfato de sódio a 13,5% em solução tampão acetato de sódio 0,02 M pH 4,0, como solução de consolidação da matriz, neste ensaio apenas se utilizou essa mesma solução.

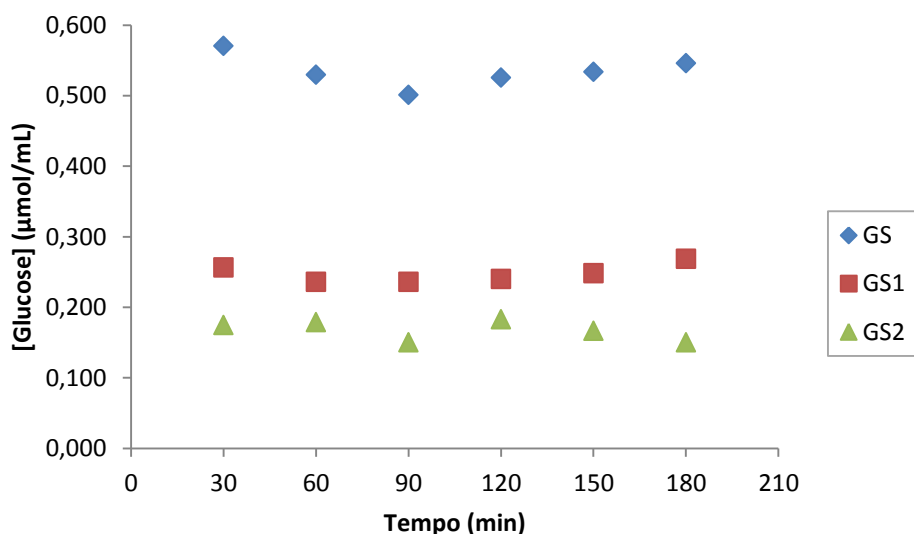


Figura 30 – Ensaios do estudo da atividade e estabilidade da pectinase de *Aspergillus niger* imobilizada em quitosano (2%) usando uma mistura glutaraldeído e sulfato de sódio como solução de consolidação da matriz. (GS) Glutaraldeído a 2% com sulfato de sódio a 13,5% em solução tampão de acetato de sódio 0,02M, pH 4,0; (1,2) 1ª, 2ª Reutilização.

Na Figura 30, verifica-se uma reduzida estabilidade operacional pois houve uma grande diminuição do primeiro ensaio para o primeiro ensaio de reutilização e deste, último, para o segundo ensaio de reutilização.

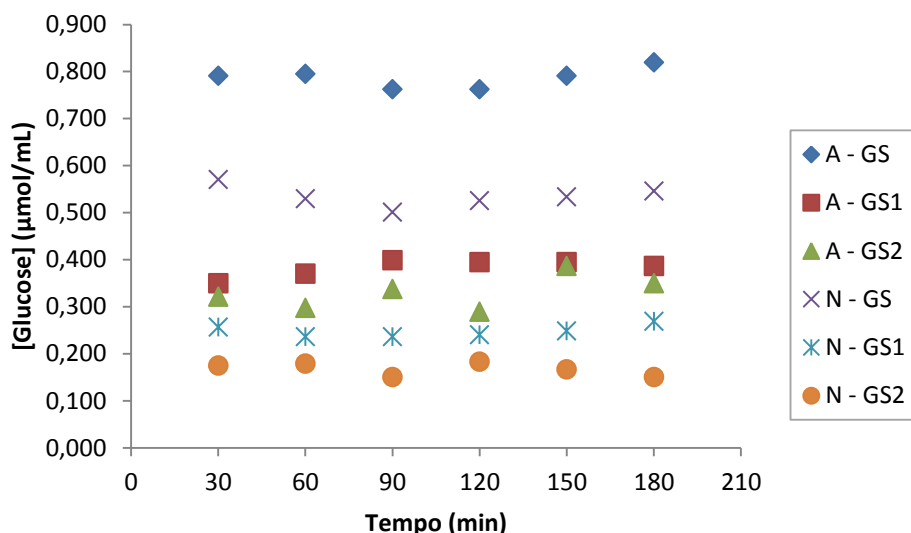


Figura 31 – Comparação dos ensaios do estudo da atividade e estabilidade das pectinases de *Aspergillus aculeatus* e *Aspergillus niger* imobilizadas em quitosano (2%), usando uma mistura glutaraldeído e sulfato de sódio como solução de consolidação da matriz. (A) *Aspergillus aculeatus*; (N) *Aspergillus niger*; (GS) Glutaraldeído a 2% com sulfato de sódio a 13,5% em solução tampão de acetato de sódio 0,02M, pH 4,0; (1,2) 1ª, 2ª Reutilização.

Como se pode observar na Figura 31, a pectinase de *Aspergillus aculeatus* imobilizada em quitosano (2%), consolidado numa mistura de glutaraldeído a 2% e sulfato de sódio a 13,5%, apresentou uma estabilidade operacional mais elevada que a pectinase de *Aspergillus niger*, imobilizada e utilizada nas mesmas condições.

É de salientar que, os resultados obtidos no ensaio da 1ª reutilização com a pectinase de *Aspergillus aculeatus* apresentam-se bastante próximos dos obtidos no ensaio GS com a pectinase de *Aspergillus niger*.

4.2 Estudo da atividade das pectinases a alta pressão

O processamento a alta pressão permite obter produtos de elevada qualidade na medida em que destrói/inativa microrganismos (incluindo esporos) presentes nos mesmos que levam à deterioração do produto e que podem afetar a saúde do consumidor. Com este trabalho pretendeu-se unir o processo a alta pressão e a pasteurização e, observar o seu efeito na reação enzimática de degradação da pectina.

Para uma melhor compreensão do efeito da pressão, torna-se necessário estudar o efeito de vários factores, nomeadamente: a pressão, a temperatura e o

tempo. Para tal, foram realizados diversos ensaios por forma a encontrar a melhor combinação destas três variáveis.

4.2.1 Estudo do efeito da pressão

Para compreender o efeito do aumento de pressão, fez-se, paralelamente, ensaios à pressão atmosférica.

Nos ensaios de alta pressão, os frascos têm que estar completamente cheios, isentos, assim, de ar

Tabela 5 – Ensaio do estudo da pectinase de *Aspergillus aculeatus* a diferentes pressões.

Pressão (MPa)	Tempo (min)	[Glucose] (μmol/mL)	
		Pectinase de <i>A. aculeatus</i> (solução)	Pectinase de <i>A. aculeatus</i> (imobilizada)
0	30	0,084	0,014
50		0,139	0,074
100		0,529	0,497
150		1,405	0,262
200		1,651	0,164

Nos ensaios realizados com pectinase de *Aspergillus aculeatus* em solução, verificou-se um aumento progressivo da degradação de pectina com o aumento de pressão.

Nos ensaios realizados com pectinase de *Aspergillus aculeatus* imobilizada, verificou-se, igualmente um aumento da degradação de pectina com o aumento de pressão, sendo, os melhores resultados obtidos aos 100 MPa.

Tabela 6 – Ensaio do estudo da pectinase de *Aspergillus niger* a diferentes pressões.

Pressão (MPa)	Tempo (min)	[Glucose] (μmol/mL)	
		Pectinase de <i>A. niger</i> (solução)	Pectinase de <i>A. niger</i> (imobilizada)
0	30	0,037	0,020
50		0,426	0,542
100		1,661	0,207
150		0,138	0,058
200		0,884	*

(*) Amostra com presença de óleo existente no vaso de alta pressão.

Relativamente aos ensaios realizados com a pectinase de *Aspergillus niger* em solução, há um aumento da degradação da pectina com o aumento de pressão. Os melhores resultados foram obtidos a 100 MPa.

Nos ensaios realizados com a pectinase imobilizada, os melhores resultados foram obtidos à pressão de 50 MPa, havendo uma diminuição progressiva dos 100 aos 150 MPa.

Comparando as duas pectinases imobilizadas, verifica-se que cada uma apresenta uma actividade máxima a uma pressão diferente, tendo sido a pectinase de *A. niger* a apresentar um melhor resultado (0,542 $\mu\text{mol/mL}$).

Observando os ensaios à pressão atmosférica sem agitação (com os ensaios a alta pressão) e os ensaios à pressão atmosférica com agitação a 150 rpm, conclui-se que, a agitação é um importante fator na reação enzimática com enzima imobilizada.

No caso da pectinase de *Aspergillus aculeatus*, no ensaio a 150 rpm obteve-se 0,457 μmol de glucose/mL enquanto que no ensaio sem agitação obteve-se apenas 0,014 μmol de glucose/mL. Estes ensaios preliminares são indicativos de problemas de transferência de massa externa.

No caso da pectinase de *Aspergillus niger*, a variação foi mínima. No ensaio a 150 rpm obteve-se 0,029 μmol de glucose/mL enquanto que no ensaio sem agitação obteve-se apenas 0,020 μmol de glucose/mL. Estes resultados refletem ligeiros problemas de transferência de massa externa.

4.2.2 Estudo do efeito do tempo

Com os ensaios que se seguem, pretendia-se determinar o mínimo tempo necessário para a quase total degradação da pectina. Para tal determinou-se estudar a reacção enzimática, a 45 °C e à pressão de 200 MPa, aos seguintes tempos: 5, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos. Para cada amostragem foi necessário um ensaio.

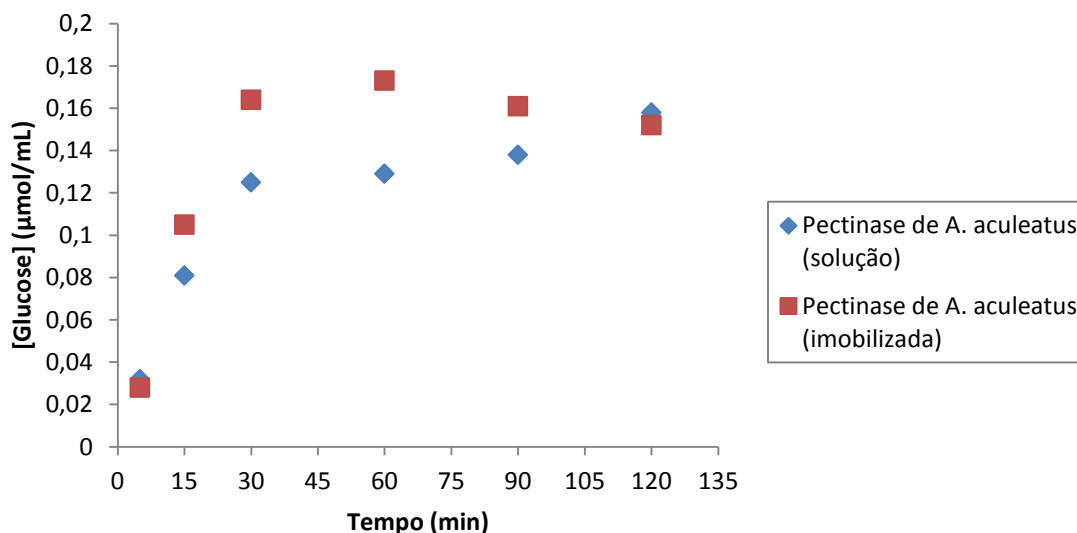


Figura 32 – Ensaio do estudo do tempo da reacção enzimática com a pectinase de *Aspergillus aculeatus* a 45 °C, a uma pressão de 200 MPa.

Nos ensaios realizados com a pectinase de *Aspergillus aculeatus* em solução, observa-se um máximo de degradação da pectina aos 120 minutos. Nos ensaios com a pectinase de *Aspergillus aculeatus* imobilizada, verifica-se uma maior formação de glucose com um máximo aos 60 minutos contudo, com pouca variação da amostra dos 30 minutos. A pectinase imobilizada apresentou, assim, melhores resultados.

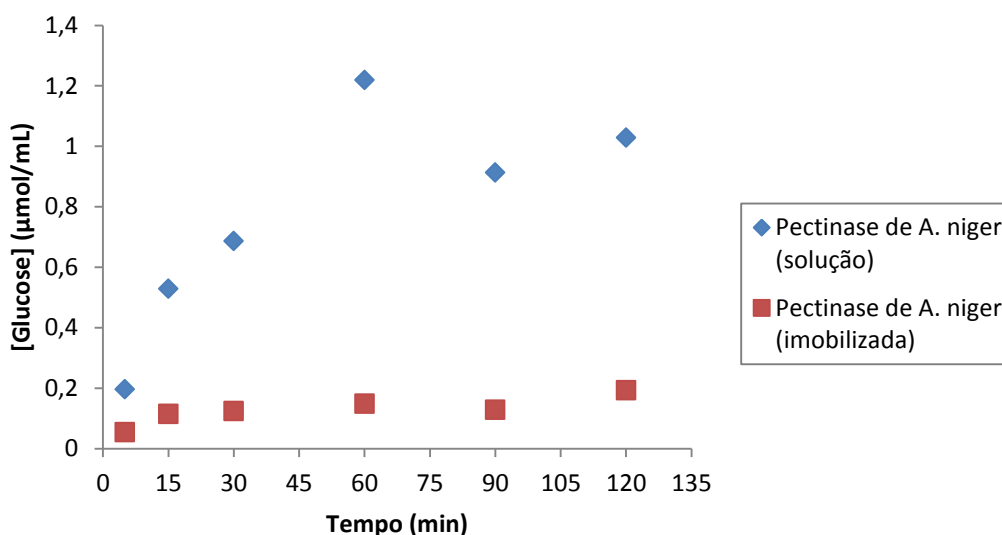


Figura 33 – Ensaio do estudo do tempo da reacção enzimática com a pectinase de *Aspergillus niger* a 45 °C, a uma pressão de 200 MPa.

Nos ensaios realizados com pectinase de *Aspergillus niger* em solução o melhor resultado foi obtido aos 60 minutos. O ensaio com esta enzima imobilizada apresentou uma atividade mais baixa que em solução, apresentando resultados semelhantes a partir dos 30 minutos.

Comparando as duas pectinases imobilizadas, há uma grande semelhança entre ambas.

Os ensaios subsequentes tiveram uma duração de 30 minutos.

4.2.3 Estudo do efeito da temperatura

Para compreender o efeito da variação da temperatura aliada ao uso de pressões elevadas fez-se, paralelamente, ensaios à pressão atmosférica.

Os ensaios seguintes foram realizados à pressão de 200 MPa.

Tanto nos ensaios a alta pressão como nos ensaios à pressão atmosférica, testaram-se as pectinases em solução e imobilizadas e, estes, foram realizados sem agitação e tiveram a duração de 30 minutos.

As temperaturas estudadas foram: 45, 55, 65, 75 e 85 °C.

Tabela 7 – Ensaios do estudo da pectinase de *Aspergillus aculeatus*, em solução e imobilizada em quitosano (2%) a diferentes temperaturas, à pressão atmosférica e a 200 MPa.

Temperatura (°C)	Tempo (min)	[Glucose] (μmol/mL)			
		Pectinase de <i>A. aculeatus</i> (solução)		Pectinase de <i>A. aculeatus</i> (imobilizada)	
		Pressão 0 MPa	Pressão 200 MPa	Pressão 0 MPa	Pressão 200 MPa
45	30	0,329	0,616	0,014	0,164
55		0,190	0,312	0,155	0,716
65		0,212	0,355	0,237	0,815
75		0,128	0,406	0,257	0,789
85		0,069	0,392	0,264	1,509

Nos ensaios realizados com a pectinase de *Aspergillus aculeatus* em solução mostrou um melhor resultado à temperatura de 45 °C, havendo uma diminuição da

sua atividade com o aumento da temperatura, tanto à pressão atmosférica como a 200 MPa.

Nos ensaios com a pectinase imobilizada, observa-se um melhoramento da atividade com o aumento da temperatura (tanto à pressão atmosférica como a 200 MPa). Os melhores resultados foram obtidos a 85 °C (a 200 MPa), mostrando, assim, o seu potencial de utilização na redução da pectina bem como da sua utilização durante a pasteurização do sumo.

Conclui-se que a imobilização de *A. aculeatus* protege do efeito da temperatura.

Tabela 8 – Ensaios do estudo da atividade da pectinase de *Aspergillus niger*, em solução e imobilizada em quitosano (2%) a diferentes temperaturas, à pressão atmosférica e a 200 MPa.

Temperatura (°C)	Tempo (min)	[Glucose] (μmol/mL)			
		Pectinase de <i>A. niger</i> (solução)		Pectinase de <i>A. niger</i> (imobilizada)	
		Pressão 0 MPa	Pressão 200 MPa	Pressão 0 MPa	Pressão 200 MPa
45	30	0,621	0,874	0,020	*
55		0,242	0,593	0,216	0,248
65		0	0,656	0,221	0,220
75		0	0,580	0,331	0,527
85		0	0,496	0,202	0,905

(*) Presença de óleo do vaso de alta pressão, na amostra.

Nos ensaios com a pectinase de *Aspergillus niger* em solução, tanto à pressão atmosférica como a 200 MPa, apresentou uma diminuição da atividade com o aumento da temperatura.

A mesma pectinase, mas imobilizada, apresentou melhores resultados a 75 °C (à pressão atmosférica) e a 85 °C (a 200 MPa), mostrando, assim, o seu potencial de utilização na redução da pectina bem como da sua utilização durante a pasteurização do sumo.

Conclui-se que a imobilização da *A. niger* em quitosano protege do efeito da temperatura.

Comparando as duas enzimas imobilizadas, a sua atividade é praticamente semelhante contudo, a *Aspergillus aculeatus* apresenta uma maior atividade a 85 °C.

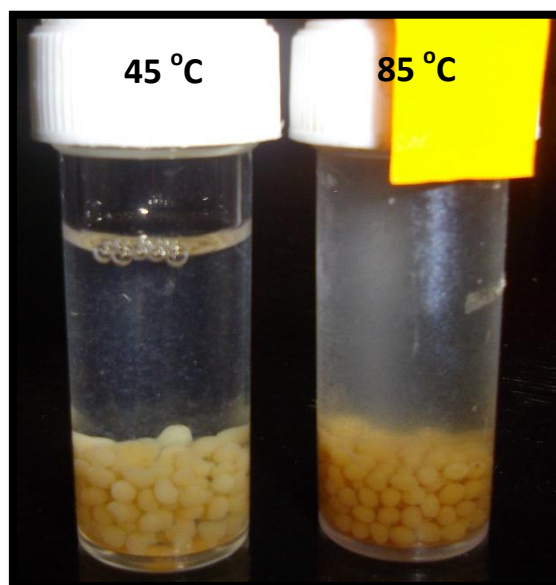


Figura 34 – Microesferas de pectinase de *Aspergillus aculeatus* após ensaio à pressão atmosférica, às temperaturas de 45 e 85 °C, respetivamente.

Observando a Figura 34 verifica-se que, as microesferas submetidas ao ensaio a uma temperatura de 85 °C apresentam-se mais escuras que as microesferas submetidas à temperatura de 45 °C e, a solução de substrato (após homogeneização) apresenta uma maior turvação.

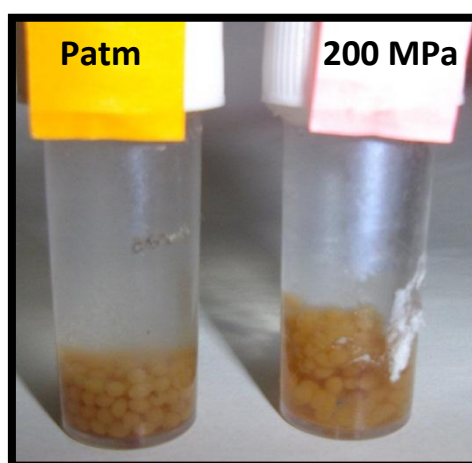


Figura 35 – Microesferas de pectinase de *Aspergillus aculeatus* após ensaios a 85 °C, submetidas à pressão atmosférica e a 200 MPa, respetivamente.

Observando a Figura 35, verifica-se que, as microesferas submetidas à pressão de 200 MPa apresentam-se aglomeradas (contrariamente às submetidas à pressão atmosférica) e, após homogeneização, estas tendem a permanecer no fundo do frasco.

4.3 Estudo da atividade das pectinases a alta pressão no sumo

Por fim, estudadas as diferentes variáveis (imobilização, pressão, tempo e temperatura), fez-se o estudo da atividade das pectinases imobilizadas no sumo. Sendo o sumo de laranja um meio mais complexo que a solução de substrato, composta por pectina e solução tampão de acetato de sódio 0,02 M pH 4,0, era necessário fazer um ensaio antes do ensaio final.

Para tal, fez-se um ensaio a uma pressão de 200 MPa com duração de 30 minutos e, testaram-se duas temperaturas: 45 e 75 °C.

Para entender o efeito da temperatura e da pressão no sumo sem adição de pectinases fez-se, paralelamente, um ensaio apenas com sumo.

Tabela 9 – Ensaio do estudo das pectinases a 45 °C e 75 °C, a uma pressão de 200 MPa, com duração de 30 minutos, no sumo.

Temperatura (°C)	Sumo não processado	[Glucose] (μmol/mL)	
		Sumo processado	
		Pectinase de <i>A. Aculeatus</i>	Pectinase de <i>A. niger</i>
45	1,377	19,614	13,468
75	2,398	7,422	5,867

Observando a Tabela 9, comparando os dois resultados do sumo não processado, a quantidade de glucose formada no sumo a 75 °C aumentou.

No geral, verifica-se que, comparativamente ao sumo isento de pectinases, há um aumento da concentração de glucose, tanto a 45 como a 75 °C.

Verifica-se, então, que a pectinase de *Aspergillus aculeatus* apresenta uma maior atividade que a pectinase de *Aspergillus niger*. Contudo, a atividade das mesmas diminui com o aumento de temperatura para 75 °C.

Por fim, realizou-se dois ensaios a 45 °C, à pressão atmosférica e a uma pressão de 200 MPa, com a duração de 120 minutos.

Tabela 10 – Ensaios do estudo das pectinases à pressão atmosférica e a 200 MPa, a 45 °C, com duração de 120 minutos, no sumo.

Pressão (MPa)	[Glucose] (μmol/mL)		
	Sumo Não processado	Sumo processado	
		Pectinase de <i>A. Aculeatus</i>	Pectinase de <i>A. niger</i>
0	1,326	1,122	1,530
200	1,632	2,550	1,428

Pode-se observar que a 200 MPa a pectinase de *Aspergillus aculeatus* apresenta maior atividade que a pectinase de *Aspergillus niger*.

Contudo, comparando com o ensaio realizado nas mesmas condições mas com uma duração de 30 minutos, verifica-se que, houve um efeito negativo na exposição prolongada da enzima à pressão de 200 MPa, obtendo-se assim, resultados mais baixos.

4.4 Análises efetuadas ao sumo

Para compreender o efeito da adição de enzimas e do tratamento a alta pressão no sumo, foram realizadas análises ao mesmo.

Foram retiradas as microesferas dos frascos e armazenou-se as amostras no congelador até à sua análise (3 meses).

4.4.1 Determinação do pH

Os resultados da determinação do pH, dos ensaios do estudo da atividade das pectinases a 45 e 75 °C, a uma pressão de 200 MPa, com duração de 30 minutos, apresentam-se na tabela seguinte.

Tabela 11 – Análise do pH do sumo dos ensaios do estudo das pectinases a 45 e 75 °C, a uma pressão de 200 Mpa (AP).

Temperatura (°C)	pH do Sumo											
	Antes AP		Após AP		Processado com pectinase de <i>A. niger</i>				Processado com pectinase de <i>A. aculeatus</i>			
45	3,72	3,72	3,71	3,71	4,20	4,03	4,25	4,36	4,38	4,37	4,38	*
75	3,84	3,84	3,79	3,79	4,37	4,41	4,43	4,40	4,50	4,54	4,54	4,56

(AP) Alta Pressão; (*) perda de amostra (frasco danificado)

Relativamente ao sumo, isento de pectinases, sujeito à temperatura de 45 °C, o pH manteve-se. Quando sujeito à temperatura de 75 °C, a descida foi mais notória. A diferença dos valores do sumo que não foi submetido à alta pressão a 45 e a 75 °C, deve-se ao facto de que o sumo usado para o ensaio dos 75 °C, esteve mais tempo exposto à oxidação perdendo, diminuindo o teor em ácido ascórbico e, assim, alguma acidez.

Tanto o sumo com pectinase de *Aspergillus niger* como o sumo com pectinase de *Aspergillus aculeatus*, sofreram um aumento considerável de pH (perderam alguma acidez), sendo que este aumento é mais notório a 75 °C. Também De Roeck *et al.* (2009) concluíram que o aumento de temperatura origina o aumento do pH.

Ainda assim, a pectinase de *Aspergillus aculeatus* originou uma maior perda de acidez que a pectinase de *Aspergillus niger*.

Os resultados da determinação do pH, dos ensaios do estudo das pectinases à pressão atmosférica e a 200 MPa, a uma temperatura de 45 °C, com duração de 120 minutos, apresentam-se na Tabela 12.

Tabela 12 – Análise do pH do sumo dos ensaios do estudo das pectinases a 45 °C, à pressão atmosférica e à pressão de 200 Mpa (AP).

Pressão (MPa)	pH do Sumo			
	Antes AP	Após AP	Processado com pectinase de <i>A. niger</i>	Processado com pectinase de <i>A. aculeatus</i>
0	3,85	3,80	4,08	4,21
200	3,81	3,71	4,33	4,50

(AP) Alta Pressão

Relativamente ao sumo isento de pectinases, verifica-se uma diminuição mais acentuada de pH no sumo que foi sujeito à pressão de 200 MPa.

Tanto à pressão atmosférica como à pressão de 200 MPa, há um aumento de pH nos sumos com presença de pectinase. Este aumento é mais notório à pressão de 200 MPa e no sumo tratado com pectinase de *Aspergillus aculeatus*.

Tabela 13 – Comparação dos valores de pH obtidos nos ensaios com duração de 30 e 120 minutos, a 45 °C e a 200 MPa.

Tempo (min)	pH do Sumo											
	Antes AP		Após AP		Processado com pectinase de <i>A. niger</i>				Processado com pectinase de <i>A. aculeatus</i>			
30	3,72	3,72	3,71	3,71	4,20	4,03	4,25	4,36	4,38	4,37	4,38	*
120	3,81		3,71		4,33				4,50			

(AP) Alta Pressão; (*) perda de amostra (frasco danificado)

Comparativamente aos valores obtidos nos ensaios com duração de 30 minutos, os ensaios com duração de 120 minutos originam uma maior perda de acidez (aumento do pH).

4.4.2 Determinação dos açúcares - °Brix

Os resultados da determinação dos açúcares, dos ensaios do estudo das pectinases a 45 e 75 °C, a uma pressão de 200 MPa, com duração de 30 minutos, apresentam-se na Tabela 14.

Tabela 14 – Análise da determinação do °Brix no sumo dos ensaios do estudo das pectinases a 45 e 75 °C, a uma pressão de 200 MPa

Temperatura (°C)	Teor em açúcares no sumo (%)											
	Antes AP		Após AP		Processado com pectinase de <i>A. niger</i>				Processado com pectinase de <i>A. aculeatus</i>			
45	11	11	11	11	9	10	10	10	9	10	10	*
75	12	12	12	12	11	11	11	11	11	11	11	11

(AP) Alta Pressão; (*) perda de amostra (frasco danificado)

Relativamente ao sumo (isento de pectinases), sujeito à temperatura de 45 °C e 75 °C, a %Brix manteve-se constante.

Tanto o sumo com pectinase de *Aspergillus niger* como o sumo com pectinase de *Aspergillus aculeatus*, sofreram uma diminuição de °Brix tanto a 45 como a 75 °C.

Os resultados dos ensaios do estudo da atividade das pectinases à pressão atmosférica e a 200 MPa, a uma temperatura de 45 °C, com duração de 120 minutos, apresentam-se na Tabela 15.

Tabela 15 – Análise da determinação do °Brix no sumo dos ensaios do estudo das pectinases a 45 °C, à pressão atmosférica e à pressão de 200 MPa.

Pressão (MPa)	Teor em açúcares no sumo (%)			
	Antes AP	Após AP	Processado com pectinase de <i>A. niger</i>	Processado com pectinase de <i>A. aculeatus</i>
0	12	12	11	11
200	12	11	11	11

(AP) Alta Pressão

Relativamente ao sumo isento de pectinases verifica-se uma diminuição de °Brix no sumo sujeito a uma pressão de 200 MPa. No sumo do ensaio à pressão atmosférica o mesmo não se verificou.

Tanto à pressão atmosférica como à pressão de 200 MPa, houve uma diminuição de °Brix nos sumos com presença de pectinase. Contudo a 200 MPa, o resultado do sumo isento de pectinases, é igual ao resultado do sumo com adição de pectinases.

Tabela 16 – Comparação dos valores de °Brix obtidos nos ensaios com duração de 30 e 120 minutos, a 45 °C e a 200 MPa.

Tempo (min)	Teor em açúcares no sumo (%)											
	Antes AP		Após AP		Processado com pectinase de <i>A. niger</i>				Processado com pectinase de <i>A. aculeatus</i>			
30	11	11	11	11	9	10	10	10	9	10	10	*
120	12		11		11				11			

(AP) Alta Pressão; (*) perda de amostra (frasco danificado)

Comparando os ensaios com duração de 30 e 120 minutos, estes apresentam-se semelhantes.

4.4.3 Determinação dos carotenoides

Os resultados da determinação dos carotenoides, dos ensaios do estudo das pectinases a 45 e 75 °C, a uma pressão de 200 MPa, com duração de 30 minutos, apresentam-se na tabela seguinte.

Para facilitar a análise dos dados, considerou-se que o sumo que não foi submetido a qualquer tratamento, apresentaria um valor de 100% e, a partir daí, determinou-se a percentagem de carotenoides presentes nas amostras.

Tabela 17 – Análise da determinação de carotenoides no sumo dos ensaios do estudo das pectinases a 45 e 75 °C, a uma pressão de 200 MPa.

Temp. (°C)		Sumo (%)											
		Antes AP		Após AP		Processado com pectinase de <i>A. niger</i>				Processado com pectinase de <i>A. aculeatus</i>			
SH	45	100	100	58,96	53,12	59,72	58,00	80,66	87,52	60,53	54,78	42,80	*
SH	75	100	100	23,16	21,32	20,42	19,45	17,06	16,43	15,57	17,10	16,06	18,26
CH	45	100	100	98,26	98,01	90,55	93,45	88,94	92,74	93,66	95,87	95,60	*
CH	75	100	100	99,46	98,04	91,34	89,78	96,88	91,18	88,16	90,54	94,18	92,56

(AP) Alta Pressão; (CH) com homogeneização; (SH) sem homogeneização; (*) perda de amostra (frasco danificado)

Relativamente à análise de carotenoides, sem homogeneização da amostra, verifica-se uma diminuição dos mesmos tanto a 45 como a 75 °C, sendo que a 45 °C não há grande diferenciação entre o sumo isento de pectinases sujeito à alta pressão e

os sumos tratados com pectinases. Já a 75 °C, os sumos com pectinases apresentam uma ligeira diminuição comparativamente ao sumo final isento de pectinases. Observa-se, então, uma maior diminuição de carotenoides no sumo sujeito à temperatura de 75 °C.

A análise de carotenoides nas amostras, após homogeneização das mesmas, teve como intuito verificar que as amostras não continham todas a mesma quantidade de carotenoides inicialmente, podendo haver maiores diferenças de valores nas amostras sem homogeneização devido a esse facto.

Os resultados da determinação de carotenoides, dos ensaios do estudo das pectinases à pressão atmosférica e a 200 MPa, a uma temperatura de 45 °C, com duração de 120 minutos, apresentam-se na Tabela 18.

Tabela 18 – Análise da determinação dos carotenoides no sumo dos ensaios do estudo das pectinases a 45 °C, à pressão atmosférica e à pressão de 200 MPa.

Pressão (MPa)		Sumo (%)			
		Antes AP	Após AP	Processado com pectinase de <i>A. niger</i>	Processado com pectinase de <i>A. aculeatus</i>
SH	0	100	*	179,43	134,52
SH	200	100	*	89,38	**
CH	0	100	99,90	98,86	98,92
CH	200	100	98,50	96,62	97,60

(AP) Alta Pressão; (SH) sem homogeneização; (CH) com homogeneização; (*) amostra homogeneizada; (**) a parte de amostra (transparente) para analisar encontrava-se a meio do tubo, dificultando a colheita.

Devido à inexistência de alguns resultados das amostras que não foram homogeneizadas, as conclusões são baseadas apenas nas amostras que sofreram homogeneização.

Comparando com o sumo que não foi sujeito a qualquer tipo de tratamento, o teor carotenoides existentes nas amostras homogeneizadas apresentou-se praticamente idêntico.

Pode-se observar que, o sumo isento de pectinases sujeito à pressão de 200 MPa, sofreu uma maior diminuição de carotenoides (ainda que pouco significativa). Comparando este resultado

Nos ensaios à pressão de 200 MPa, os sumos tratados com pectinases, apresentaram uma diminuição mais significativa comparativamente ao sumo isento das mesmas.

A pectinase de *A. niger* originou maior perda de carotenoides que a pectinase de *A. aculeatus*, contudo a diferença entre ambas as pectinases é muito pouco significativa.

4.4.4 Determinação do ácido ascórbico (Vitamina C)

Os resultados da determinação do ácido ascórbico, dos ensaios do estudo da atividade das pectinases a 45 e 75 °C, a uma pressão de 200 MPa, com duração de 30 minutos, apresentam-se na Tabela 19.

Tabela 19 – Análise da determinação do ácido ascórbico no sumo dos ensaios do estudo da atividade das pectinases a 45 e 75 °C, a uma pressão de 200 MPa.

Temperatura (°C)	Teor de ácido ascórbico no sumo (mg/mL)					
	Antes AP	Após AP	Processado com pectinase de <i>A. niger</i>		Processado com pectinase de <i>A. aculeatus</i>	
45	1,28	1,28	0,80	0,80	0,76	0,76
75	1,28	1,16	0,56	0,56	0,48	0,48

(AP) Alta Pressão

Como na análise do pH as amostras apresentam uma elevada semelhança decidiu-se analisar apenas metade do total de amostras.

O sumo sujeito aos ensaios, isento de pectinases, apenas apresentou uma diminuição de ácido ascórbico aos 75 °C, verificando-se então, uma degradação do ácido ascórbico com o aumento da temperatura.

Em ambos os ensaios, houve um decréscimo acentuado de ácido ascórbico nos sumos com pectinases, sendo este decréscimo mais notório a 75 °C e nos sumos que continham a pectinase de *Aspergillus aculeatus*.

Os resultados da determinação do ácido ascórbico, dos ensaios do estudo das pectinases à pressão atmosférica e a 200 MPa, a uma temperatura de 45 °C, com duração de 120 minutos, apresentam-se na Tabela 20.

Tabela 20 – Análise da determinação do ácido ascórbico no sumo dos ensaios do estudo das pectinases a 45 °C, à pressão atmosférica e à pressão de 200 MPa.

Pressão (MPa)	Teor em ácido ascórbico no sumo (mg/mL)			
	Antes AP	Após AP	Processado com pectinase de <i>A. niger</i>	Processado com pectinase de <i>A. aculeatus</i>
0	1,28	1,28	0,92	0,88
200	1,28	1,24	0,80	0,76

(AP) Alta Pressão

O sumo sujeito aos ensaios, isento de pectinases, apenas apresentou uma diminuição de ácido ascórbico a 200 MPa, verificando-se então, uma degradação do ácido ascórbico com o aumento da pressão. Contudo, este decréscimo é mínimo.

Em ambos os ensaios, houve um decréscimo acentuado de ácido ascórbico nos sumos com pectinases, sendo este decréscimo mais notório a 200 MPa e nos sumos que continham a pectinase de *Aspergillus aculeatus*.

Tabela 21 – Comparação dos valores de ácido ascórbico, obtidos nos ensaios com duração de 30 e 120 minutos, a 45 °C e a 200 MPa.

Tempo (min)	Teor em ácido ascórbico no sumo (mg/mL)					
	Antes AP	Após AP	Processado com pectinase de <i>A. niger</i>		Processado com pectinase de <i>A. aculeatus</i>	
30	1,28	1,28	0,80	0,80	0,76	0,76
120	1,28	1,24	0,80		0,76	

(AP) Alta Pressão

Comparando os ensaios com duração de 30 e 120 minutos, o teor em ácido ascórbico mantém-se.

4.4.5 Análise visual

De acordo com a Figura 36, comparativamente ao sumo não sujeito a qualquer tipo de tratamento, observa-se uma decantação mais acentuada nos sumos tratados com pectinases, havendo uma grande semelhança entre o sumo tratado com a pectinase de *Aspergillus niger* e a pectinase *Aspergillus aculeatus*.

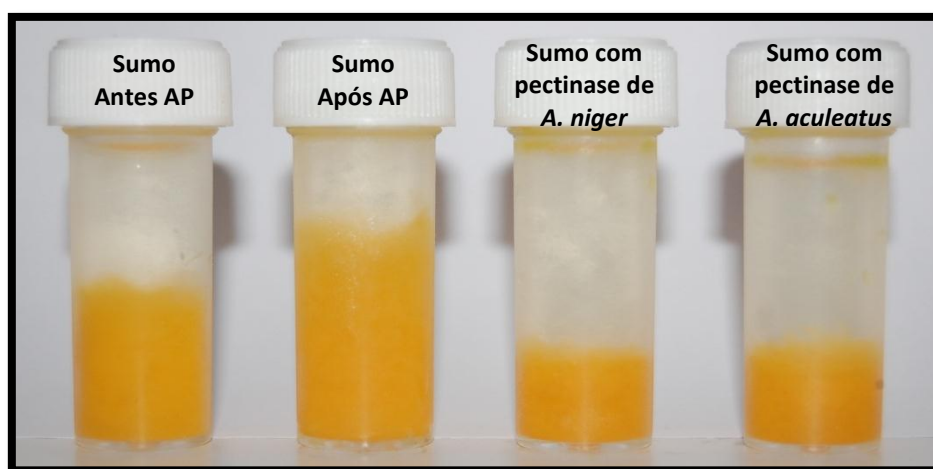


Figura 36 – Amostras do ensaio realizado a 45 °C, a uma pressão de 200 MPa, com duração de 30 minutos. (AP) Alta Pressão

A Figura 37, referente ao ensaio realizado a 75 °C, a uma pressão de 200 MPa, com duração de 30 minutos, apresenta uma decantação mais acentuada que a verificada no ensaio a 45 °C contudo, menos notória na amostra com pectinase de *Aspergillus niger*. A pectinase de *Aspergillus aculeatus* foi a mais eficaz na clarificação do sumo.

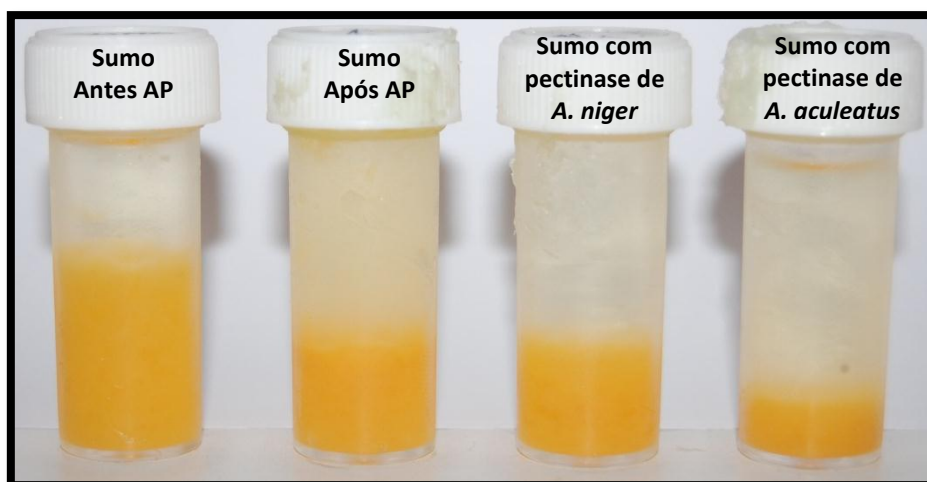


Figura 37 – Amostras do ensaio realizado a 75 °C, a uma pressão de 200 MPa, com duração de 30 minutos. (AP) Alta Pressão

A Figura 38 apresenta as amostras do ensaio realizado a 45 °C, a uma pressão de 200 MPa, com duração de 120 minutos. Em comparação ao sumo que não foi sujeito a qualquer tipo de tratamento, as amostras com pectinases apresentam uma decantação mais acentuada e, ambas, muito semelhante. Comparativamente ao ensaio nas mesmas condições mas com uma duração de apenas 30 minutos (Figura 36), não se verificam grandes diferenças.

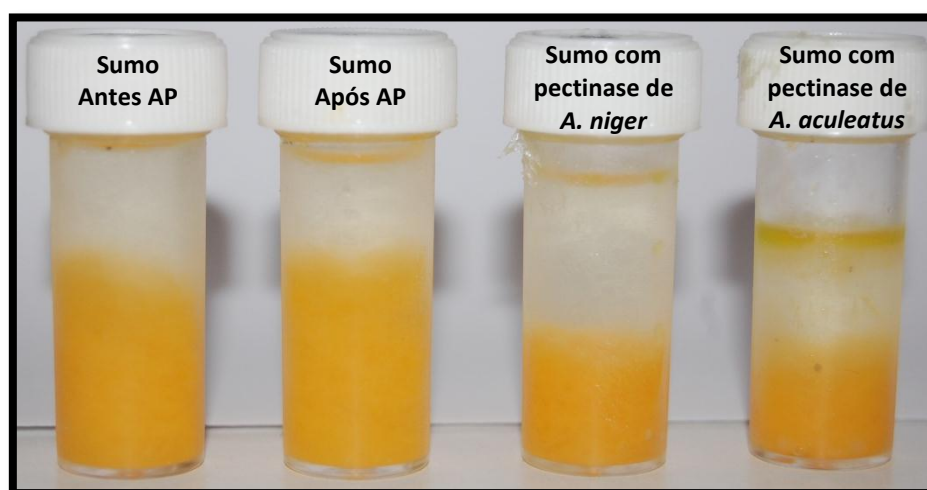


Figura 38 – Amostras do ensaio realizado a 45 °C, a uma pressão de 200 MPa, com duração de 120 minutos. (AP) Alta Pressão

Observando as Figuras 39 e 40, verifica-se que há melhor decantação nas amostras submetidas a 200 MPa do que nas amostras submetidas à pressão atmosférica, ainda que essa diferença seja ligeira.

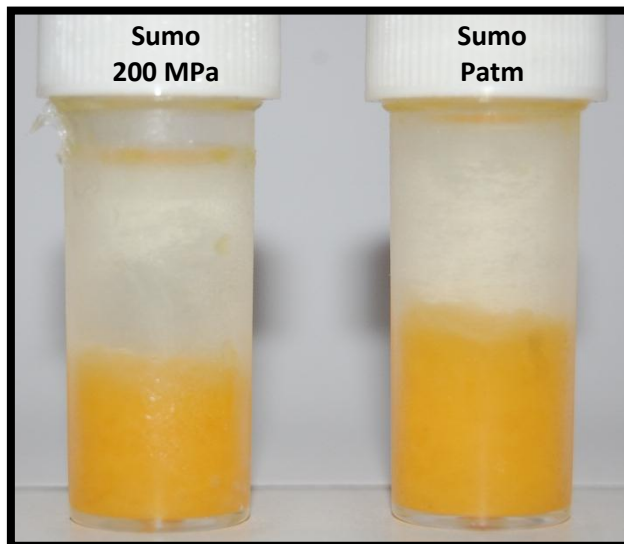


Figura 39 – Amostras do ensaio realizado com pectinase de *Aspergillus niger*, à temperatura de 45 °C, a 200 MPa e à pressão atmosférica, com duração de 120 minutos.

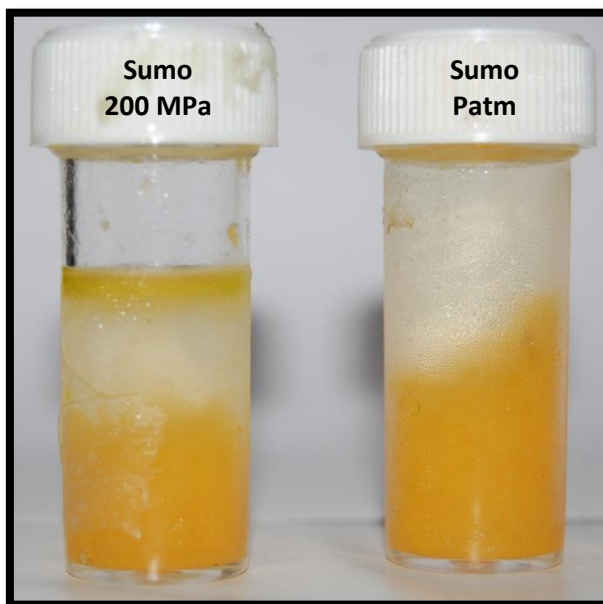


Figura 40 – Amostras do ensaio realizado com pectinase de *Aspergillus aculeatus*, à temperatura de 45 °C, a 200 MPa e à pressão atmosférica, com duração de 120 minutos.

Capítulo 5 Conclusões

5. Conclusões

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que fatores como a temperatura, a concentração de substrato e enzima, bem como a pressão, têm um papel muito importante na atividade das pectinases. Também a agitação é um facto determinante para se atingir uma maior atividade das pectinases imobilizadas, devido aos problemas de transferência de massa externa.

Para ambas as pectinases (*A. aculeatus* e *A. niger*) em solução, o aumento da concentração de enzima e substrato origina o aumento da sua atividade enzimática pois, quanto maior a quantidade de enzima mais rápida será a reação e, quanto maior a quantidade de substrato maior a quantidade de pectina a degradar.

Quanto à variação de temperatura, apesar de ainda apresentarem atividade a temperaturas elevadas (80-90 °C), esta diminui comparativamente a temperaturas mais baixas, levando-nos a concluir que estas enzimas não toleram temperaturas de pasteurização.

A temperatura ótima encontrada para a pectinase de *A. aculeatus* foi de 60 °C contudo, os seus resultados não se diferenciaram muito dos resultados obtidos no ensaio realizado a 45 °C.

Relativamente à imobilização das pectinases, a melhor solução de consolidação da matriz foi a mistura de glutaraldeído a 2% com sulfato de sódio a 13,5%. Contudo, ambas as pectinases imobilizadas apresentam fraca estabilidade nos ensaios de reutilização. Todavia, a pectinase de *A. aculeatus* apresenta melhor atividade que a pectinase de *A. niger*.

Comparando as enzimas imobilizadas e em solução, estas últimas apresentam maior atividade.

Paralelamente aos ensaios a alta pressão foram feitos ensaios à pressão atmosférica.

Para além da enzima imobilizada, também foram feitos estudos com enzima em solução.

Segundo os resultados obtidos, conclui-se que, para a pectinase de *A. aculeatus* é a que tolera pressões mais elevadas, comparativamente à pectinase de *A. niger* (tanto em solução como imobilizadas). Contudo, a imobilização das pectinases diminui essa tolerância.

No estudo do tempo de ensaio, conclui-se que, para ambas pectinases, são apenas necessários 30 minutos, uma vez que ao fim deste tempo há uma semelhança de resultados entre pectinases e, também, porque não se pretende que toda a pectina do sumo de laranja seja degradada.

Nos ensaios do estudo do efeito da temperatura verificou-se que, tanto a imobilização como o processamento a alta pressão (200 MPa) protegem as enzimas do efeito da temperatura. Nestas condições, torna-se possível aliar o tratamento enzimático à pasteurização e ao processamento a alta pressão.

Contudo, nos ensaios efetuados com sumo, observou-se que 45 °C é a temperatura ideal para o ensaio, levando à conclusão de que não é possível aliar o tratamento enzimático à pasteurização e ao processamento a alta pressão.

O tempo ideal de ensaio é de 30 minutos, uma vez a exposição prolongada (120 minutos) a pressões elevadas (200 MPa) apresentaram um efeito negativo na atividade das enzimas.

Após os ensaios, analisou-se o sumo ao nível do pH, °Brix, teor em carotenoides e ácido ascórbico, por forma a perceber o efeito da alta pressão, da temperatura e do tempo de ensaio no sumo.

Relativamente à análise do pH, observou-se que este aumenta com o aumento de temperatura, pressão e tempo de ensaio, sendo que este aumento é mais acentuado nos sumos tratados com pectinase de *A. aculeatus*.

Na análise do °Brix, verificou-se que o teor em açúcares se manteve semelhante ao longo de todos os ensaios, ou seja, a pressão, a temperatura e o tempo de ensaio não influenciam este parâmetro.

A análise do teor em carotenoides e do teor em ácido ascórbico, mostrou que o aumento de temperatura e pressão origina uma diminuição do seu teor, sendo esta diminuição mais acentuada no sumo tratado com pectinase de *A. aculeatus*.

Numa análise visual, conclui-se que a melhor clarificação do sumo é alcançada à pressão elevada (200 MPa), bem como à temperatura elevada (75 °C), sendo que a pectinase de *A. aculeatus* foi a mais eficaz. Relativamente ao tempo de ensaio, são necessários apenas 30 minutos para se obter uma melhor clarificação.

Capítulo 6

Trabalho Futuro

Na sequência deste trabalho, vários estudos poderão ser realizados. De seguida, apresentam-se algumas sugestões.

Para completar o trabalho já realizado, seria importante fazer paralelamente um estudo da viscosidade, podendo até, assim, determinar o teor em pectina no sumo.

Sendo que, neste trabalho, foram estudadas duas pectinases diferentes que se apresentavam em estados físicos distintos (líquido e sólido), seria interessante estudar a mesma enzima, mas em estados físicos diferentes.

Neste trabalho, a consolidação das microesferas foi efetuada usando o glutaraldeído como reticulante químico e o sulfato de sódio como reticulante físico. Esta é uma etapa crucial para a obtenção de melhores resultados. Assim sendo, esta deverá ser uma etapa a explorar, substituindo, por exemplo, o glutaraldeído pelo glioxal, e o sulfato de sódio por polifosfato de sódio ou tripolifosfato de sódio, tendo sempre em conta que o produto final tem como destino o consumo humano.

As pressões estudadas neste trabalho são, na teoria, consideradas como pressões moderadas. Como tal, seria estimulante fazer ensaios usando pressões mais elevadas (p. ex. até 600 MPa) e com isto, fazer paralelamente um estudo da atividade da PME existente naturalmente no sumo, uma vez que esta pectinase não é desejável no sumo de laranja.

Poder-se-ia fazer todos estes estudos em diversos sumos (p. ex.: maçã, limão, etc.) de forma a determinar qual a enzima mais adequada a cada sumo, pois cada sumo apresenta características e exigências diferentes.

Referências Bibliográficas

1. Abbès, F., Bouaziz, M., Blecker, C., Masmoudi, M., Attia, H., Besbes, S. (2011) "Date syrup: Effect of hydrolytic enzymes (pectinase/cellulase) on physico-chemical characteristics, sensory and functional properties" *Food Chemistry* 44, pp. 1827–1834
2. Alimardani-Theuil, P., Gainvors-Claisse, A., Duchiron, F. (2011) "Yeasts: Na attractive source of pectinases – From gene expression to potential applicantions: A review" *Process Biochemistry* 46, pp. 1525–1537
3. Alkorta, I., Garbisu, C., Llama, M., Serra, J. (1998) "Industrial applications of pectic enzymes: a review", *Process Biochemistry* 33, I, pp. 21–28
4. Biró, E., Németh, Á. S., Sisak, C., Feczko, T., Gyenis, J. (2008) "Preparation of chitosan suitable for enzyme immobilization" *Journal of Biochemical and Biophysical methods* 70, pp. 1240–1246
5. Bradford, M. M. (1976) "A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograma quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding" *Analytical Biochemistry* 72, pp. 248–254
6. Bull, M. K., Zerdin, K., Howe, E., Goicoechea, D., Paramanandhan, P., Stockman, R., Sellathewa, J., Szabo, E. A., Johnson, R. L., Stewart, C. M. (2004) "The effect of high pressure processing on the microbial, physical and chemical properties of Valencia and Navel orange juice" *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 5, pp. 135–149
7. Butz, P., Fernández García, A., Lindauer, R., Dieterich, S., Bognár, A., Tauscher, B. (2003) "Influence of ultra high pressure processing on fruit and vegetable products" *Journal of Food Engineering* 56, pp. 233–236
8. Cabral, J. M. S., Aires-Barros, M. R., Gama, M. (2003) "Engenharia Enzimática" LIDEL - Edições Técnicas, Lda. Lisboa, pp. 1–57
9. Chen, X-G., Liu, C-S., Liu, C-G., Meng, X-H., Lee C. M., Park, H. J. (2006) "Preparation and biocompatibility of chitosan microcarries as biomaterial. *Biochemical Engineering Journal* 27, pp. 269-274

10. Chiu, S-H., Chung, T-W., Giridhar, R., Wu, W-T. (2004) "Immobilization of β -cyclodextrin in chitosan beads for separation of cholesterol from egg yolk" *Food Research International* 37, pp. 217–223
11. Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R. M., Chiellini, E. (2011) "Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications" *Progress in Polymer Science* 36, pp. 981–1014
12. de Gregorio, A., Mandalani, G., Arena, N., Nucita, F., Tripodo, M. M., lo Curto, R. B. (2002) "SCP and crude pectinase production by slurry-state fermentation of lemon pulps" *Bioresource Technology* 83, pp. 89–94
13. De Roeck, A., Duvetter, T., Fraeye, I., Van der Plancken, I., Ndaka Sila, D., Van Loey, A., Hendrickx, M. (2009) "Effect of high-pressure/high-temperature processing on chemical pectin conversions in relation to fruit and vegetable texture", *Food Chemistry* 115, 207–213
14. Dutta, P., Ravikumar, M., Dutta, J. (2002): "CHITIN AND CHITOSAN FOR VERSATILE APPLICATIONS" *Journal of Macromolecular Science, Parte C: Polymer Reviews*, 42:3, 307–354
15. Duvetter, T., Sila, D. N., Van Buggenhout, S., Jolie, R., Van Loey, A., Hendrickx, M. (2009) "Pectins in Processed Fruit and Vegetables: Part I—Stability and Catalytic Activity of Pectinases" *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 8, pp. 75–85
16. Eisenmenger, M. J., Reyes-De-Corcuera, J. I. (2009) "High pressure enhancement of enzymes: A review" *Enzyme and Microbial Technology* 45, pp. 331–347
17. Fawote, O. B., Odunfa, S. A. (2003) "Some factors affecting production of pectic enzymes by *Aspergillus niger*." *International Biodeterioration and Biodegradation* 52, pp. 223–227
18. Fernández-González, M., Úbeda, J. F., Vasudevan, T. G., Otero, R. R. C., Biones, A. I. (2004) "Evaluation of polygalacturonase activity in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains" *FEMS Microbiology Letters* 237, pp. 261–266
19. Fraeye, I., Knockaert, G., Van Buggenhout, S., Duvetter, T., Hendrickx, M., Van Loey, A. (2010) "Enzyme infusion prior to thermal/high pressure processing of strawberries: Mechanistic insight into firmness evolution" *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 11, pp. 23–31

20. Furtado, A. F. M., Nunes, M. A. P., Ribeiro, M. H. L. (2012) "Hesperidinase encapsulation towards herperitin production targeting improved bioavailability. *Journal of Molecular Recognition* 25, pp: 595–603
21. Gupta, K. C., Jabrail, F. H. (2006) "Effects of degree of deacetylation and cross-linking on physical characteristics, swelling and release behavior of chitosan microspheres" *Carbohydrate Polymers* 66, 43–54
22. Harholt, J., Suttangkakul, A., Scheller, H. V. (2010) "Biosynthesis of Pectin" *Plant Physiology* 153, pp. 384–395
23. Jayani, R. S., Saxena, S., Gupta, R. (2005) "Microbial pectinolytic enzymes: A review" *Process Biochemistry* 40, pp. 2931–2944
24. Jin, W., Brennan, D. (2002) "Properties and applications of proteins encapsulated within sol-gel derived materials. *Analytica Chimica Acta* 461, pp. 1–36
25. Kashyap, D. R., Vohra, P. K., Chopra, S., Tewari, R. (2001) "Applications of pectinases in the comercial sector: a review" *Bioresource Technology* 77, pp. 215–227
26. Krajewska, B. (2004) "Applicantion of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review" *Enzyme and Microbial Technology* 35, pp. 126–139
27. Kruger, N.J. (1994) "Basic Protein and Peptide Protocols" *Methods in Molecular Biology* 32, pp. 9–15
28. Kumar, R. M. N. V. (2000) "A review of chitin and chitosan applications" *Reactive & Functional Polymers* 46, pp. 1–27
29. Lei, Z., Bi, S., Yang, H. (2007a) "Chitosan-tethered the sílica particle from a layer-by-layer approach for pectinase immobilization" *Food Chemistry* 104, pp. 577–584
30. Lei, Z., Bi, S. (2007b) "The sílica-coated chitosan particle from a layer-by-layer approach for pectinase immobilization" *Enzyme and Microbial Techonology* 40, pp. 1442–1447

31. Lei, Z., Jiang, Q. (2011) "Synthesis and Properties of Immobilized Pectinase onto the Macroporous Polyacrylamide Microspheres" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, pp.2592–2599
32. Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M., Fernandez-Lafuente, R. (2007) "Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques" *Enzyme and Microbial Technology* 40, pp. 145 – 1463
33. Miletić, N., Nastasović, A., Loos, K. (2012) "Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: Possibilities, advantages, applications" *Bioresource Technology* 115, pp. 126–135
34. Pereira, J. A. N. (2010) "Estudo da estabilidade, actividade e cinética enzimática da lacase em líquidos iónicos." – Dissertação apresentada com vista à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química – Universidade de Aveiro.
35. Plaza, L., Duvetter, T., Van der Plancken, I., Meersman, F., Van Loey, A., Hendrickx, M., (2008) "Influence of environmental conditions on thermal stability of recombinant *Aspergillus aculeatus* pectinmethylesterase", *Food Chemistry* 111, pp. 912–920
36. Polydera, A. C., Stoforos, N. G., Taoukis, P. S. (2003) "Comparative shelf life study and vitamin C loss kinetics in pasteurised and high pressure processed reconstituted orange juice" *Journal of Food Engineering* 60, pp. 21–29
37. Polydera, A. C., Stoforos, N. G., Taoukis, P. S. (2005) "Effect of high hydrostatic pressure treatment on post processing antioxidant activity of fresh Navel orange juice." *Food Chemistry* 91, pp. 495–503
38. Prathyusha, K., Suneetha, V. (2011) "Bacterial Pectinases and their Potent Biotechnological Application in Fruit Processing/Juice Production Industry: A Review", *Journal of Phytology* 3(6), pp. 16–19
39. Oey, I., Lille, M., Loey, A. V., Hendrickx, M. (2008a) "Does high pressure processing influence nutritional aspects of plant based food systems?" *Trends in Food Science and Technology* 19, pp. 300–308
40. Oey, I., Lille, M., Loey, A. V., Hendrickx, M. (2008b) "Effect of high pressure processing on colour, texture and flavor of fruit and vegetable based food products: a review." *Trends in Food Science and Technology* 19, pp. 320–328

41. Ridley, B. L., O'Neill M. A., Mohnen, D. (2001) "Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide related signaling" *Phytochemistry* 57, pp. 929–967
42. Saqib, A. A. N., Whitney, P. J. (2011) "Differential behaviour of the dinitrosalicylic acid (DNS) reagent towards mono- and di-saccharide sugars" *Biomass and Bioenergy* 35, pp. 4748–4750
43. Sheldon, R. A. (2007) "Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance" *Advanced. Synthesis & Catalysis* 349, pp. 1289–1307
44. Sila, D., Duvetter, T., de Roeck, A., Verlent, I., Smout, C., Moates, G., Hills, B., Waldron, K., Hendrickx, M., Van Loey, A. (2008) "Texture changes of processed fruits and vegetables: potential use of high-pressure processing" *Food Science & Technology* 19, pp. 309–319
45. Takei, T., Ikeda, K., Ijima, H., Kawakami, K. (2011) "Fabrication of poly(vinyl alcohol) hydrogel beads crosslinked using sodium sulfate for microorganism immobilization" *Process Biochemistry* 46, pp. 566–571
46. Timmermans, R., Mastwijk, H., Knol, J., Quataert, M., Vervoort, L., Van der Plancken, I., Hendrickx, M., Matser, M. (2011) "Comparing equivalent thermal, high pressure and pulsed electric field processes for mild pasteurization of orange juice. Part I: Impact on overall quality attributes", *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 12, pp. 235–243
47. Tischer, W., Wedekind, F. (1999) "Immobilized enzymes: methods and applications" Ed: Fressner, W. D. (Ed.), *Biocatalysis – From Discovery to Application*. Springer Verlag, Berlin, pp. 95–126
48. Uenojo, M., Pastore, G. M. (2007) "Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. *Química Nova* 30, Nº2, pp. 388–394
49. Vidal, S., Doco, T., Williams, P., Pellerin, P., York, W. S., O'Neill, M. A., Glushka, J., Darvill, A. G., Albersheim, P. (2000) "Structural characterization of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II: evidence for the backbone location of the aceric acid-containing oligoglycosyl side chain" *Carbohydrate Research* 326, pp. 277–294
50. Vila-Real, H., Alfaia, A. J., Calado, A. R. T., Ribeiro, M. H. L. (2007) "High pressure-temperature effects on enzymatic activity: Naringin bioconversion" *Food Chemistry* 102, pp. 565-570.

51. Vila-Real, H., Alfaia, A. J., Rosa, M. E., Calado, A. R., Ribeiro, M. H. L. (2010) "An innovative sol-gel naringinase bioencapsulation process for glycosides hydrolysis" *Process Biochemistry* 45, pp. 841–850
52. Zandleven, J., Sorensen, S. O., Harholt, J., Beldman, G., Schols, H. A., Scheller, H. V., Voragen, A. J. (2007) "Xylogalacturonan exists in cell walls from various tissues of *Arabidopsis thaliana*" *Phytochemistry* 68, pp. 1219–1226
53. Yapo, B. M., Lerouge, P., Thibault, J., Ralet, M. (2007) "Pectins from citrus peel cell walls contain homogalacturonans homogenous with respect to molar mass, rhamnogalacturonan I and rhamnogalacturonan II" *Carbohydrate Polymers* 69, pp. 426–435
54. Yapo, B. M. (2011a) "Pectin Rhamnogalacturonan II: On the "Small Stem with Four Branches" in the Primary Cell Walls of Plants" *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, Artigo ID 964521, 11 páginas. doi:10.1155/2011/964521
55. Yapo, B. M. (2011b) "Pectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectins – A new hypothetical model" *Carbohydrate Polymers* 86, pp. 373–385
56. Yu, L., Zhang, X., Li, S., Liu, X., Sun, L., Liu, H., Iteku, J., Zhou, Y., Tai, G. (2010) "Rhamnogalacturonan I domains from ginseng pectin" *Carbohydrate Polymers* 79, pp. 811–817